

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ESSENCES

### AU POINT DE VUE DE LEURS PROPRIÉTÉS ANTISEPTIQUES

#### ESSENCE DE NIAOULI, ESSENCE DE CAJEPUT

Par M. le Dr F. FORNÉ.

Médecin de la marine, en retraite.

(Travail du laboratoire de M. Chamberland.)

Voulant ajouter une nouvelle essence, — l'essence de niaouli<sup>1</sup> ou mélaleucène, — à la liste de celles déjà étudiées dans ces *Annales* par M. Chamberland (1887), nous avons naturellement appliqué à celle-ci le mode d'expérimentation employé pour les autres.

Cette méthode consiste, comme on sait, à mettre dans un tube à deux branches, d'un côté l'essence à étudier, de l'autre le milieu de culture qui, dans les essais de M. Chamberland, a été exclusivement de l'eau de levure neutre et stérilisée. On ferme le tube et on le laisse reposer quelques jours, pour donner aux vapeurs le temps de saturer le liquide. Puis on ensemence dans ce liquide de la bactérie charbonneuse.

Il nous a semblé qu'il y aurait quelque intérêt à opérer simultanément avec l'essence de niaouli et l'essence de cajeput<sup>2</sup>

1. Niaouli, nom canaque qui sert à désigner deux espèces ou variétés de Mélaleuques. *Melaleuca viridiflora* (Gaertner); *Melaleuca rubriflora* (Vieillard) : arbres très répandus à la Nouvelle-Calédonie, où ils forment des forêts considérables.

2. Caju-puti, caju-kila, noms malais désignant aussi des Mélaleuques qui ressemblent au niaouli. *Melaleuca leucodendron*, appelé *caju-puti* dans l'Inde orientale; *melaleuca minor*, appelé *caju-puti* et *caju-kila* à Amboine : arbres très communs à Java et dans les autres îles de l'Asie équatoriale.

Du mot malais caju-puti on a fait par corruption cajeput.

Les Mélaleuques comme les Eucalyptus appartiennent à la famille des Myrtacées, tribu des Leptospermées.

déjà connue, à cause de la communauté d'origine de ces deux essences, communauté que ne laisse pas soupçonner leur différence d'aspect physique. En effet, l'essence de niaouli rectifiée est incolore, tandis que l'essence de cajeput est toujours verte. Cette couleur est due à la présence d'un sel de cuivre provenant soit de l'appareil distillatoire, soit, plus probablement, d'une addition voulue.

Pour faire l'expérience, nous avons mis dans des tubes Pasteur de l'essence de niaouli et de l'essence de cajeput, en présence d'eau de levure neutre et stérilisée. Onze jours après, on aensemencé de la bactériodie charbonneuse dans la branche contenant de l'eau de levure. Les tubes contenant les essences restent stériles, pendant que des tubes témoins se peuplent abondamment. Onze jours après l'ensemencement, on coupe les branches ensemencées et restées stériles des tubes à essence, on les ferme avec un tampon de coton stérilisé, et on les met à l'étuve. Quatre ou cinq jours après, elles donnent un développement de la bactériodie charbonneuse.

On peut donc conclure : 1° que l'essence de niaouli doit être rangée dans le groupe nombreux des essences dont les vapeurs en vase clos s'opposent à la culture ;

2° Que les vapeurs de l'huile de niaouli, pas plus que celles de l'huile de cajeput, ne tuent la bactériodie charbonneuse, puisqu'il a suffi de laisser dégager les vapeurs de ces essences pour que le terrain ensemencé et resté stérile pendant onze jours soit devenu propre à la culture.

M. Chamberland n'avait pas employé, dans ses premières expériences, d'autres microbes d'épreuve que la bactériodie charbonneuse. J'ai pensé qu'il y aurait intérêt à voir comment se comportaient les essences ci-dessus sur des mucédinées, et j'ai fait, avec l'*aspergillus niger* et le *penicillium glaucum*, diverses séries d'expériences avec des dispositifs variés.

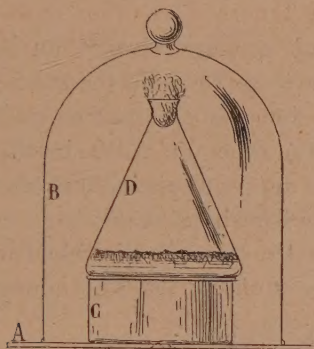
Un premier groupe d'expériences a été fait avec le dispositif qui précède, sauf que le liquide Raulin remplace l'eau de levure, et que l'*aspergillus niger* est substitué à la bactériodie charbonneuse.

Les résultats de cette expérience sont, du reste, identiques à ceux déjà signalés : culture complète dans les tubes témoins ; nulle dans les tubes soumis à l'action des vapeurs d'essence



tant qu'a duré cette action. Le liquide Raulin resté stérile pendant 53 jours est devenu fertile dès que les vapeurs d'essence ont pu disparaître par évaporation ou par oxydation.

Dans un second groupe d'expériences, j'ai agrandi l'espace clos dans lequel le liquide de culture et la vapeur restent en présence. Sous une cloche rodée *b* reposant sur une lame de verre rodée, on dispose un cristallisoir *c* contenant l'essence, et, au-dessus de ce cristallisoir, un matras *d* bouché avec un tampon de coton et renfermant le liquide de culture.



Voici le résumé d'une de mes expériences.

13 mars 1893. — Neuf matras reçoivent chacun 10 c. c. de liquide Raulin et sont stérilisés. Trois de ces matras serviront de témoins. Ce sont les matras *T*; ils reposent sur des cristallisoirs vides. Les trois matras *N* et les trois matras *C* sont ceux reposant sur des cristallisoirs qui reçoivent respectivement 2 c. c. d'essence de niaouli et d'essence de cajepout.

Ces neuf matras sont répartis en trois groupes renfermant chacun un matras *T*, un matras *N* et un matras *C*. Un jour d'intervalle sépare l'ensemencement des matras de chaque groupe.

16 mars. — Ensemencement, avec *l'aspergillus niger*, des matras du premier groupe, qui sont recouverts de leur cloche de verre et placés sur le rebord intérieur d'une fenêtre du laboratoire.

24 mars. — Matras *T* : culture complète, ayant fructifié sur toute la surface. Matras *N* et *C*, culture stérile; pas la moindre trace de mycélium.

Réensemencé les matras *N* et *C*, opération qui entraîne forcément le renouvellement de l'air de la cloche déjà saturé de vapeurs d'essence.

12 avril. — La culture *N* est toujours stérile; la culture *C* présente un mycélium constitué par des flocons blancs encore isolés les uns des autres.

30 avril. — Rien encore en N. Exclusivement du mycélium dans le matras C.

L'ensemencement des matras des deux autres groupes a été fait respectivement les 17 et 18 mars, c'est-à-dire après quatre et cinq jours d'action des vapeurs d'essence.

Les résultats de ces deux expériences, à la date du 30 avril, ont été les suivants : culture complète dans les matras T ; culture exclusivement mycélienne dans les matras N et C, après un second ensemencement de ces matras.

Ainsi, après un premier ensemencement des six matras soumis à l'action des essences, la culture a été nulle dans ces matras.

Après un second ensemencement au bout de huit jours, la culture est restée nulle dans un matras N ; elle a été exclusivement mycélienne dans les cinq autres matras.

Nous avons répété exactement et simultanément les mêmes expériences avec les spores de *penicillium glaucum*, empruntées à une culture naturelle sur citron et ensemencées dans neuf matras ayant reçu chacun 10 c. c. de liquide Raulin additionné de chlorure de calcium à  $\frac{1}{1000}$ , et disposés comme dans les expériences avec l'*aspergillus niger*.

Ici encore la culture n'a été complète que dans les trois matras témoins ; elle a été exclusivement mycélienne dans les six matras soumis à l'action des essences, mais sans qu'il ait été nécessaire de recourir à un double ensemencement de ces matras.

Le fait le plus général qui se dégage du deuxième groupe d'expériences peut être ainsi énoncé : en agissant dans des espaces clos, les essences étudiées ont toujours empêché la fructification des mucédinées. Elles protègent mieux un terrain de culture contre l'*aspergillus niger* que contre le *penicillium glaucum*.

J'ajoute que l'action de l'huile de niaouli s'est montrée un peu plus énergique que celle de l'huile de cajeput dans les deux séries d'expériences.

Remarquons en terminant que le dispositif expérimental employé ici permettrait de se procurer des quantités considérables de mycélium d'une mucédinée si l'utilisation de ce produit présentait un jour quelque intérêt.



Un troisième groupe d'expériences, dans le détail desquelles je n'entrerai pas, m'a montré que les deux mucédinées ci-dessus, ensemencées dans du liquide Raulin additionné d'essence, y restaient sans se développer jusqu'au moment où l'essence s'était oxydée ou évaporée au travers du tampon de coton bouchant le matras.

J'ai cherché alors à préciser l'influence du temps écoulé entre le moment de l'addition de l'essence et celui de l'ensemencement, et j'ai trouvé commode de faire cette étude avec les tubes à pomme de terre imaginés par M. Roux.

L'étranglement qu'ils portent vers leur quart inférieur, qui empêche la pomme de terre de tomber au fond, a aussi l'avantage de créer un réservoir dans lequel on peut déposer diverses substances volatiles en vue d'étudier leur action sur les nombreux organismes qui se cultivent sur la pomme de terre.

J'ai fait avec la pomme de terre et le *penicillium glaucum* un grand nombre d'expériences formant trois séries.

SÉRIE A. — La série A comprend les expériences dans lesquelles l'action des essences est contemporaine de l'ensemencement de la mucédinée.

1<sup>er</sup> mars 1893. — Douze tubes pour culture sur pomme de terre, préalablement stérilisés, sont partagés en trois groupes.

Quatre de ces tubes, T, serviront de témoins, quatre sont additionnés d'essence de niaouli : ce sont les tubes N ; enfin, quatre reçoivent de l'essence de cajeput : ce sont les tubes C.

Dans chacun de ces trois groupes, deux tubes sont ensemencés avec du mycélium et les deux autres avec des spores.

1<sup>er</sup> avril. — Tubes T. Culture abondante.

Tubes N et C. Des huit pommes de terre soumises à l'action des vapeurs d'essences, il en est quatre — celles ensemencées avec du mycélium — qui ont donné une culture exclusivement mycélienne, tout à fait misérable et limitée à une partie de la face ensemencée. Les quatre autres, ensemencées avec des spores, présentent les caractères suivants : culture nulle à l'extrémité inférieure de la pomme de terre ; culture mycélienne au-dessus de cette région préservée, mycélium disposé sous forme de plis tortueux donnant à la culture un aspect gaufré ; ce mycélium n'est sporifère qu'à l'extrémité supérieure de la pomme de terre.

La culture dans les deux tubes C est plus étendue que dans les deux tubes N.

L'addition des essences le jour même de l'ensemencement a donc eu pour effet d'empêcher le développement de la mucédinée

sur la portion inférieure du fragment de pomme de terre, et de limiter la fructification du mycélium à la région la plus éloignée du dépôt d'essence.

Comment expliquer ce résultat? Il est dû probablement, à la fois, à ce que la partie inférieure de la pomme de terre est la plus rapprochée du réservoir d'essence, et à ce que sa partie supérieure est plus voisine de l'air extérieur, avec lequel elle communique au travers du tampon de coton qui ferme le tube. La densité de la vapeur, en prenant ce mot dans son sens ordinaire, doit donc aller en diminuant du bas au haut du tube.

SÉRIE B. — La série B comprend 7 expériences analogues aux précédentes, comprenant chacune un tube C, un tube N, et un tube témoin, mais dans lesquelles l'ensemencement de la mucédinée n'était pas contemporain de l'introduction de l'essence : il a été fait après 1, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 jours d'action des vapeurs d'essence sur la pomme de terre stérilisée.

Ces expériences ont mis en relief l'importance du rôle joué par l'état du terrain de culture au moment de l'ensemencement.

Le développement des spores de *penicillium*, si rapide et si complet sur les pommes de terre des tubes témoins, reste nul à l'extrémité inférieure des pommes de terre soumises à l'action des essences, et est constamment retardé sur les points où il se produit.

Cette action retardatrice ou empêchante, déjà sensible quand l'ensemencement est fait 24 heures après que la pomme de terre a été soumise à l'action des vapeurs d'essence, devient de plus en plus apparente quand cette action précède de plusieurs jours l'ensemencement. Dans ce dernier cas, la culture est de moins en moins étendue; elle est réduite à la phase mycélienne sur la face ensemencée, dont elle n'occupe qu'une partie, et, quand elle devient complète, ce n'est que sur la face de section supérieure de la pomme de terre.

SÉRIE C. — La série C comprend les expériences dans lesquelles on a fait agir les essences directement sur les spores de *penicillium* plusieurs jours avant leur ensemencement sur des pommes de terre stérilisées par la chaleur.



13 mars 1893. — Avec deux pipettes chargées respectivement d'huile de niaouli et d'huile de cajeput, nous arrosons les spores de deux cultures de *penicillium glaucum* sur pommes de terre.

31 mars. — Ensemencement sur pommes de terre des spores de ces deux cultures.

30 avril. — Il existe un contraste frappant entre les deux cultures :

Les spores au cajeput ont donné une culture exclusivement mycélienne, tout à fait misérable et limitée à une partie seulement de la face ensemencée.

Les spores au niaouli ont donné un mycélium abondant et d'un blanc éclatant, formant des plis ou saillies rappelant par leurs dispositions tortueuses les circonvolutions cérébrales. Il y a évidemment à la fois hyper-genèse de mycélium et obstacle à son étalement en surface ; les plis tortueux font une saillie très notable au-dessus du niveau de la pomme de terre et débordent de chaque côté les points d'implantation du mycélium. Pendant une quinzaine de jours, ces circonvolutions mycéliennes n'ont occupé que la face ensemencée ; plus tard, le mycélium a gagné les parties latérales. Lorsque les spores vertes ont apparu sur ce mycélium blanc, la culture a offert un bel aspect qui la faisait facilement différencier des cultures ordinaires de la même mucédinée.

Finalement, la pomme de terre a été couverte sur les deux tiers de sa surface par une couche épaisse de mycélium et de spores.

Dans une autre expérience, faite avec des spores soumises 22 jours à l'action des essences, j'ai retrouvé le même contraste et les mêmes particularités de culture que dans l'expérience précédente.

La parité d'action des deux essences cesse donc dès qu'elles sont mises directement en contact avec les spores : dans les expériences précédentes, les vapeurs seules des essences étaient en action, dans les expériences de la série C un nouveau facteur est entré en jeu. L'huile de cajeput renfermant une proportion notable de cuivre, il est possible que ce métal ait eu sa part d'action dans la diminution de la vitalité des spores arrosées avec cette huile ; cette diminution a été telle que la fructification de la mucédinée a été impossible et que même sa végétation a été presque nulle.

L'essence de niaouli, au contraire, pure de toute addition métallique et dont l'action, par suite, représente mieux celle des essences en général, a exalté l'énergie végétative des spores.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. Les vapeurs d'essence de niaouli comme celles d'essence de cajeput agissant dans des espaces clos et étroits s'opposent

à la culture de la bactériodie charbonneuse et de l'*aspergillus niger* ;

II. Les mêmes vapeurs agissant dans des espaces clos, mais plus larges, ont empêché dans tous les cas la fructification des mucédinées ;

III. L'action empêchante ou stérilisante des vapeurs d'essence s'exerce principalement sur le milieu de culture ;

IV. La puissance stérilisante des vapeurs d'essence est proportionnelle au temps pendant lequel ces vapeurs ont agi sur le milieu de culture, et au degré d'imprégnation dudit milieu par lesdites vapeurs ;

V. Toutes choses égales d'ailleurs, les vapeurs d'essence de niaouli stérilisent mieux un terrain de culture que les vapeurs d'essence de cajeput ;

VI. L'essence de niaouli mise en contact direct avec les spores de *penicillium glaucum* a augmenté leur énergie végétative.

---



# SUR LE VIEILLISSEMENT DES VINS

PAR E. DUCLAUX

---

Que se passe-t-il dans un vin qui vieillit, et qui, après avoir commencé par s'améliorer, finit par *vieillarder* et se perdre ? C'est là un phénomène dont nous ne connaissons encore que le gros, et dont les détails nous échappent. L'effet produit résulte évidemment à la fois de la réaction intérieure des éléments du vin les uns sur les autres, et de l'intervention des agents extérieurs, dont les mieux connus sont d'un côté l'oxygène, de l'autre les microbes. En fait d'agents intérieurs, M. Berthelot nous a appris qu'entre l'alcool et les acides fixes et volatils du vin il se produit des éthers dont l'influence sur le bouquet n'est pas douteuse. De son côté, l'oxygène qui pénètre dans le vin commence par oxyder sa matière colorante, par le *dépouiller*. J'ai montré que, lorsqu'il est aidé de l'action de la lumière, il est capable d'agir sur beaucoup d'autres éléments du vin, la glycérine, l'acide tartrique, l'alcool, en donnant de l'aldéhyde, de l'acide formique, etc. Il est vrai que le vin est toujours conservé à l'abri de la lumière, mais, si l'action solaire accélère d'ordinaire celle de l'oxygène, elle n'est pas indispensable pour cela, et, de même qu'un vin se dépouille fort bien dans une cave obscure, il peut se faire aussi que ses autres éléments restent exposés à une oxydation lente, mais continue.

Dans le but d'étudier ces phénomènes, j'avais réservé, lors des *Études sur le vin*<sup>1</sup> que j'avais faites en 1872, des échantillons des vins que j'avais étudiés, et dont je connaissais bien la constitution, tant en acides fixes qu'en acides volatils. Quatre de ces vins ont été chauffés, de façon à être soustraits à l'influence des actions microbiennes et abandonnés à leurs réactions intérieures. Pour accélérer celles-ci le plus possible, sans trop m'éloigner des conditions ordinaires de la conservation des vins, j'avais mis mes

1. *Annales de Chimie et de Physique*, 5<sup>e</sup> série, t. II, 1874.

vins dans des bouteilles en verre blanc, fermées par des bouchons sans cire, et, au lieu de les garder à la cave, je les ai laissées depuis dans le laboratoire, avec la seule précaution de les enfermer dans des armoires où n'entrait pas le jour. La matière colorante s'est rapidement précipitée dans ces conditions. Au bout de 2 à 3 ans, les échantillons étaient complètement dépouillés. Pour laisser aux autres actions de combustion, que je savais plus lentes, le temps nécessaire pour commencer, sinon pour devenir complètes, j'ai conservé pendant un peu plus de 20 ans ces vins chauffés, et ne les ai analysés qu'en 1893.

A côté de ces vins chauffés, j'avais placé des échantillons de deux des mêmes vins non chauffés, tous deux envahis par le ferment de l'*amer* et le ferment du *tourné*, mais en quantités inégales. Dans l'un, c'était le filament du *tourné* qui dominait de beaucoup ; c'était le filament du vin *amer* dans l'autre. Ces vins, déjà malades au moment de la mise en bouteilles, ont continué à se détériorer. Il n'était nullement nécessaire d'attendre pour eux aussi longtemps que pour les autres. Je les ai analysés en 1884, après 12 ans de conservation, et j'ai comparé leur état de maladie à ce moment avec celui que je leur avais trouvé et décrit dans mon mémoire de 1874.

Les résultats fournis par cette étude comparative étant très nets, quelques mots suffiront pour les exposer.

A. *Vin du Puy-de-Dôme, atteint surtout de la maladie de la pousse avec quelques filaments de l'amer.* — C'est le vin que j'ai étudié page 319 de mon mémoire. Son acidité totale évaluée en acide acétique, était mesurée par les chiffres suivants :

Au moment de l'analyse (nombres du mémoire).....	6 gr. 45	par litre.
Au moment du chauffage.....	6 gr. 84	—
Au moment de la seconde analyse : vin chauffé.....	6 gr. 84	—
Au moment de la seconde analyse : vin non chauffé.	9 gr. 60	—

L'acidité totale n'a donc pas varié en 20 ans dans le vin chauffé, elle a au contraire beaucoup augmenté dans l'autre en 12 ans. Pour savoir sur quoi a porté l'augmentation, il n'y a qu'à chercher ce que sont devenus les acides fixes et les acides volatils.

Dans mon mémoire, j'avais dit que ce vin contenait en 1872 2<sup>gr</sup>,55 d'acide acétique et 2<sup>gr</sup>,60 d'acide métacétique par litre. Depuis, l'existence de l'acide métacétique de Nicklès est



devenue douteuse, et j'ai moi-même dit ' qu'après avoir étudié un échantillon d'acide métacétique qui provenait de Nicklès lui-même, je n'avais trouvé aucune différence entre lui et l'acide propionique pur, provenant de cyanure d'éthyle. En tenant compte de la petite quantité d'impuretés rencontrée dans l'acide métacétique de M. Nicklès, j'ai été conduit à modifier légèrement les chiffres qui précèdent, et je considère aujourd'hui ce vin comme contenant en 1872 2<sup>gr</sup>,58 d'acide acétique et 2<sup>gr</sup>,56 d'acide propionique par litre.

Au moment du chauffage, la quantité d'acides volatils avait légèrement augmenté, mais leur proportion était restée la même, et la marche de la distillation, conduite suivant les règles indiquées dans mon mémoire, n'avait pas sensiblement varié. Elle n'a pas varié non plus du moment du chauffage au moment de la seconde étude. Les acides volatils du vin sont donc restés au bout de 20 ans ce qu'ils étaient au moment du chauffage, et, en particulier, il n'y a eu aucune apparition en quantités sensibles d'un acide volatil nouveau par suite d'un procès d'oxydation.

De la constance de l'acidité totale et de l'acidité volatile, je crois pouvoir conclure à celle de l'acidité fixe, au moins comme quantité. S'il y avait eu transformation chimique d'un acide fixe, ce ne pourrait avoir été qu'en un autre acide fixe de même équivalent. C'est un fait dont je ne connais pas d'exemples. Concluons donc, en ce qui regarde les acides, que le chauffage les a immobilisés dans leur quantité et dans leur qualité.

Restent maintenant à envisager les transformations subies par les corps neutres principaux, alcool et glycérine. Les procédés de dosage de la glycérine dans un vin sont trop imparfaits pour permettre d'apprécier de petites différences dans la quantité de ce produit. Mais la glycérine en s'oxydant donne des acides fixes ou volatils, et nous avons vu qu'il n'y avait aucune variation de ce chef. L'alcool mérite une étude plus détaillée, parce qu'en s'oxydant il peut donner de l'aldéhyde. Je n'avais pas recherché ni dosé ce produit dans mon vin en 1872. Je manquais par conséquent de terme de comparaison. Je me suis contenté de m'assurer que la quantité d'alcool contenue dans le vin n'avait pas varié d'une quantité sensible à un dosage alcoométrique.

trique, et que l'aldéhyde qu'on trouvait dans le liquide distillé était en proportions comparables à celles qu'on trouve dans les vins ordinaires, et ne dépassait dans aucun des vins étudiés 3 décigrammes par litre, le dosage étant fait par le procédé colorimétrique de Schiff. Ce sont des proportions voisines de celles qui, d'après M. Røser<sup>1</sup>, résultent du fonctionnement normal du ferment alcoolique. Il est curieux de voir que cette aldéhyde ne s'est pas oxydée en vingt ans, en donnant des acides volatils qu'eût manifestés la méthode d'analyse.

Toute la transformation subie par l'alcool consiste en une éthérification au contact des acides volatils contenus dans le vin. Cet alcool était très odorant et, étudié au compte-gouttes, d'après la méthode que j'ai fait connaître dans mon mémoire de 1872, il donnait 144 gouttes et demie pour un titre alcoolique de 9°. A la même température, de l'alcool pur au même titre eût donné 140 gouttes et demie. La différence, qui n'est pas moindre de 4 gouttes, correspond aux éthers ayant accompagné l'alcool dans sa distillation.

Voilà pour ce qui concerne le vin chauffé. Le vin non chauffé a continué à se détériorer de 1872 à 1884. Nous avons vu plus haut que l'acidité totale y avait passé de 6<sup>gr</sup>,84 à 9<sup>gr</sup>,60, l'évaluation faite en acide acétique. Pour étudier la variation de l'acidité volatile, il n'y a qu'à soumettre le vin à la distillation fractionnée, suivant les procédés que j'ai indiqués dans mon mémoire, et à comparer la marche de la distillation pour les divers échantillons. Voici comment s'est distribué l'acide dans les 10 prises successives, chacune de 10 c.c., obtenues en traitant comme je l'ai dit : 1° le vin initial ; 2° le même vin au moment du chauffage ; 3° le même vin 12 ans après, au moment de la dernière étude :

	Vin initial 1872.	Même vin au moment du chauffage.	Même vin 12 ans après.
1 <sup>re</sup> prise	9,4	9,6	9,5
2 <sup>e</sup> —	48,8	49,2	49,0
3 <sup>e</sup> —	28,3	28,8	28,7
4 <sup>e</sup> —	37,9	38,4	38,3
5 <sup>e</sup> —	47,6	48,0	47,9
6 <sup>e</sup> —	57,4	57,6	57,4
7 <sup>e</sup> —	67,3	67,6	67,4
8 <sup>e</sup> —	77,6	78,0	77,8
9 <sup>e</sup> —	88,4	88,4	88,4
10 <sup>e</sup> —	100,0	100,0	100,0

1. Ces Annales, t. VII, p. 41.



On voit que le parallélisme est aussi parfait que possible. Les acides volatils ont donc continué à se produire dans ce vin, dans les mêmes proportions que celles qui y existaient à l'origine. Voici, dès lors, les quantités d'acide acétique et propionique par litre en 1872 et en 1884 :

1872.	2 gr. 58	d'acide acétique et	2 gr. 56	d'acide propionique.
1884.	3 gr. 94	— —	3 gr. 91	— —

Comme j'avais eu, en 1872, la précaution de distiller 4 litres de vin de façon à en retirer les acides volatils, j'ai pu m'assurer que l'acide mélangé à l'acide acétique était bien de l'acide propionique.

Voyons maintenant ce qui est relatif aux acides fixes. L'acidité totale correspondait en 1872 à 6<sup>gr</sup>,45 d'acide acétique et à 9<sup>gr</sup>,60 en 1884. D'autre part, les acides volatils signalés ci-dessus correspondent à 4<sup>gr</sup>,65 d'acide acétique en 1872 et à 7<sup>gr</sup>,11 en 1884. Les acides fixes correspondent donc en 1872 à 1<sup>gr</sup>,84 d'acide acétique, et à 2<sup>gr</sup>,5 en 1884. Il y a donc eu augmentation des acides fixes en même temps que des acides volatils. Il faut rapprocher ce fait de ce que le vin était atteint à la fois de la maladie de la pousse, qui fait disparaître les acides fixes, et de la maladie de l'amer, qui les augmente. Malheureusement tout ce qui se rapporte aux acides fixes dans le vin est encore très mal connu, et je n'ai pas cru devoir pousser plus loin l'analyse des phénomènes. On ne la fera bien que lorsqu'on saura cultiver les ferments de ces maladies, et qu'on pourra étudier leurs actions dans des milieux de constitution plus simple que ne l'est le vin.

B. *Vin du Puy-de-Dôme, atteint surtout de la maladie de l'amer, avec quelques filaments de la pousse.* — C'est le vin que j'ai étudié page 323 de mon mémoire de 1874. Comme l'étude a été semblable à celle du vin qui précède, je me bornerai à une simple mention des résultats :

*Vin chauffé.*

	1872	1893
Acidité totale évaluée en acide acétique	6 gr. 0	6 gr. 0
— volatile — —	1 gr. 9	1 gr. 9

L'acidité volatile est une fraction de l'acidité totale plus faible qu'avec les vins poussés, mais ni les acides fixes, ni les acides

volatils n'ont varié en quantité. Il en est de même en qualité : c'est, en 1893 comme en 1872, un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique dans les proportions que nous allons retrouver tout à l'heure.

Le titre alcoolique du vin est de 9°,4. L'alcool à ce titre donne 147 gouttes au compte-gouttes, au lieu de 142,5 pour l'alcool pur. La différence est de 4,5 gouttes. La quantité d'éther formé est donc toujours assez grande.

*Vin non chauffé.*

	1872	1884
Acidité totale évaluée en acide acétique	6 gr. 0	8 gr. 6
— volatile — —	1 gr. 9	4 gr. 0
— fixe, par différence	4 gr. 1	4 gr. 6

Il y a donc eu augmentation simultanée des acides fixes et volatils.

La distillation fractionnée, appliquée à l'étude des acides volatils, montre que leur composition est à très peu près la même en 1872 et 1884, et correspond à un mélange de 36 molécules d'acide acétique contre 1 d'acide butyrique. Il y avait donc dans un litre de ce vin :

	1872	1884
Acide acétique	4 gr. 88	3 gr. 88
— butyrique	0 gr. 08	0 gr. 17

Le vin chauffé a donc encore été ici immobilisé par le chauffage. Le vin non chauffé a continué à s'altérer sous la double influence du ferment de l'amer et du ferment du poussé. Que l'action du premier ait été prédominante, c'est ce qui est démontré à la fois par la faiblesse du chiffre relatif à l'acidité volatile dans ce dernier cas, et par la nature de l'acide présent, qui était surtout de l'acide acétique à peine mélangé d'un peu d'acide butyrique.

C. *Vin du Puy-de-Dôme de 1866.* — C'est le vin dont j'ai parlé page 344 de mon mémoire. Voici le résultat de la comparaison du vin au moment du chauffage en 1872, et du vin chauffé étudié en 1892 :

A. — *Vin chauffé.*

	1872	1892
Acidité totale évaluée en acide acétique	5 gr. 1	5 gr. 1
— volatile — —	0 gr. 63	0 gr. 63



Donc, aucune variation ni dans l'acidité fixe, ni dans l'acidité volatile qui était dans les deux cas formée de 0<sup>sr</sup>,61 d'acide acétique et 0<sup>sr</sup>,025 d'acide butyrique par litre.

L'alcool provenant de ce vin, et titrant 10°,6 à l'alcoomètre, donnait au compte-gouttes, à 15°, 148 gouttes au lieu de 146. Il y avait moins d'éther que dans les vins qui précèdent et celui qui suit, sans doute parce que l'acidité volatile y était aussi beaucoup plus faible.

D. *Vin du Puy-de-Dôme.* — Les résultats fournis par l'analyse de ce vin sont les mêmes que pour le vin qui précède. L'acidité totale s'est montrée la même en 1872 et en 1893. Les acides volatils étaient formés, pour les deux vins, de 1<sup>sr</sup>,98 d'acide propionique et de 2<sup>sr</sup>,04 d'acide acétique. Je me suis assuré par une épreuve directe qu'il n'y avait pas d'acide formique. Quant à l'alcool, il donnait, pour un titre alcoolique de 8°,5, 144 gouttes au compte-gouttes à 15° au lieu de 139,5. Donc, encore ici, beaucoup d'éthers.

Concluons donc de l'ensemble de ces résultats qu'il n'y a aucune oxydation sensible dans les vins débarrassés de leurs germes de maladie par le chauffage, et maintenus à la cave, dans les conditions ordinaires de leur conservation, c'est-à-dire à l'abri de la lumière, alors même que l'oxygène peut arriver par voie de diffusion au contact du liquide. Le seul effet accessible jusqu'ici à l'expérience est une éthérification de l'alcool. Quant au dépôt de matière colorante, qui semble exiger une oxydation préalable, je ne l'aborde pas ici. Je montrerai bientôt que c'est un phénomène de coagulation, dans lequel l'oxygène ne joue qu'un rôle secondaire et, sinon effacé, du moins dominé de beaucoup par les propriétés colloïdales de la matière colorante.

---

# SUR LA PHAGOCYTOSE DANS L'ACTINOMYCOSE

PAR M. LE P<sup>r</sup> A. PAWLOWSKY ET MAG. MAKSUTOFF.

(Travail du laboratoire de pathologie chirurgicale de l'Université de Kieff.)

(Avec les planches VIII et fig. 3 et 4 de la planche IX.)

---

Malgré les nombreux travaux sur l'actinomycose de l'homme et des animaux, on n'a pas encore résolu la question de la lutte entre l'organisme et le parasite, ni même celle des relations réciproques entre ce parasite et les cellules des tissus. Nous voudrions montrer qu'il s'agit encore ici d'une phagocytose véritable, avec ses formes classiques bien nettes.

Bollinger (1) et Israël (2) ont déjà admis que dès que le parasite a pénétré dans les tissus par une voie quelconque, il s'entoure des éléments granulaires, ce qui a fait donner à la tumeur qui se produit dans cette maladie le nom de *granulome infectieux* (Cohnheim). Les recherches ultérieures de Johné (3), Moorbrugger (4) et autres, ont fait voir qu'il ne s'agit pas seulement d'une accumulation des éléments granuleux, qui dégénèrent ensuite, mais que, de même que les leucocytes, les cellules fixes du tissu néo-formé se transforment en cellules épithélioïdes et géantes. On a donc été conduit à se représenter la structure d'un nodule actinomycotique comme une sorte de masse mycélienne radiée en forme de glande, entourée d'éléments granulaires parmi lesquels se trouvent des cellules épithélioïdes et géantes. Beaucoup d'auteurs assimilent même la structure d'un actinomycome à celle d'un tubercule. La différenciation résulterait de ce que le tubercule devient seulement caséeux, tandis que l'actinomycome subit une dégénérescence graisseuse suivant les uns, puriforme suivant les autres, et se transforme définitivement en tissu cicatriciel.

On admet que la propagation du foyer primitif se fait par les liquides des tissus, ou même par la voie sanguine, sans intervention des éléments cellulaires. Dans ces derniers temps seulement, quelques observateurs ont vu des parasites dans les cellules : ainsi



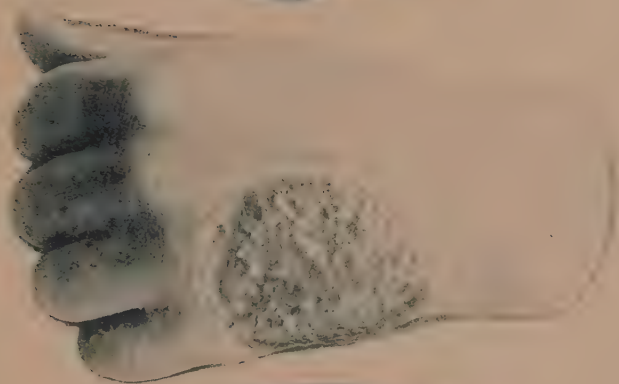








2



3



1





Marchand (5) en signale dans les leucocytes et les cellules géantes. Dans un des meilleurs travaux publiés sur l'actinomycose, Boström (6) signale aussi des filaments parasites dans les leucocytes. Ces filaments sont parfois plus longs que la cellule, et celle-ci a souvent des dimensions exagérées et contient un nucléole bulleux. On voit alors avec le temps se former dans cette cellule des figures karyokinétiques; son protoplasma perd la propriété de se colorer, ses contours et ceux du nucléole s'effacent, et la cellule périt, laissant aux filaments toute liberté pour s'épanouir en nodules radiés. D'après Boström, la propagation du parasite se fait par les leucocytes, mais seulement dans la région de la réaction inflammatoire. Ce savant n'a pourtant pas observé dans tous ses stades cette transformation du filament en nodules radiés, et ne la considère que comme probable; il admet aussi que les leucocytes ne sont pas la seule voie de dissémination du parasite dans l'organisme. Avant Boström, Fischer avait admis sans la contester la propagation du champignon par voie cellulaire, et Babes (8) avait seulement observé la présence de filaments d'une longueur variable dans de grandes cellules sans nucléoles.

La question de la voie de propagation de l'actinomycose dans l'organisme reste donc ouverte, si bien que, tout récemment encore, Hesse a défendu la théorie de la transmission extracellulaire.

Nos observations ont porté sur trois cas d'actinomycose humaine<sup>1</sup>, et sur quatre cas d'actinomycose des bêtes à cornes, dont un provenait d'une inoculation faite par l'un de nous. Les tissus ont été durcis par l'alcool, puis inclus dans la paraffine: les coupes ont été colorées avec l'hématoxyline de Ranvier, puis par la fuschine de Gram, ou encore avec l'hématoxyline et l'éosine.

Sur toutes nos préparations, tant humaines qu'animales, les tableaux microscopiques étaient tout à fait identiques: le nodule développé avait la forme d'un capitule avec renflements péricellulaires. Ce capitule était contenu dans une ou plusieurs cellules épithélioïdes (fig. 3, 5, 8, 9; pl. VIII); des couches d'autres cellules toutes pareilles entouraient de tous côtés sur une large

1. Nous les devons à M. Le Prof. Sonnenburg, de Berlin, auquel nous adressons ici nos sincères remerciements.

étendue le bouton parasitaire, et possédaient un nucléole globulaire placé excentriquement (fig. 8 et 9). Quand le nodule était jeune, le protoplasma des cellules ainsi que le parasite présentaient une coloration bien marquée.

Après de ces parasites en capitules, enfermés dans des cellules épithélioïdes, nous avons trouvé dans d'autres cellules toutes pareilles des filaments isolés, cylindriques ou renflés sur leur longueur (fig. 6). Quelques-uns montraient comme un commencement de ramification, et les deux rameaux en doigts de gants (fig. 1, *a*) étaient aussi renflés à leurs extrémités (fig. 9). Parmi les cellules épithélioïdes (*Bildungszellen* de Ziegler, *macrophages typiques* de E. Metchnikoff) se trouvaient des cellules plus petites (fig. 8 et 9) placées à la périphérie du bouton parasitaire, munies et même parfois bondées de filaments en bâtonnets. Plus la cellule était jeune, plus elle était petite, et plus les filaments qu'elle contenait étaient courts et sans renflements (fig. 1, *b c d*; fig. 2, *b*). En outre, nous avons vu que dès le commencement de la dégénérescence régressive du macrophage, les filaments grandissaient à l'intérieur de la cellule et se développaient en capitules (fig. 4, 5, 11).

La question de savoir comment les filaments entrent dans les cellules se résout quand on étudie avec soin un nodule actinomycotique avec son capitule parasitaire entièrement développé. Les cellules qui contiennent le mycélium subissent sur beaucoup de points, comme nous l'avons dit, une dégénérescence régressive, et se disloquent successivement. Sous le microscope, ces cellules prennent un aspect granuleux, une coloration plus faible du protoplasma, une modification de forme du nucléole : leurs contours deviennent moins nets, et elles se transforment en masses protoplasmiques sans nucléole (fig. 10 à 14, 17, 18). A leur voisinage on voit apparaître de jeunes cellules épithélioïdes qui saisissent les parties libres des filaments des capitules parasitaires (fig. 8 et 9, *a*).

Si le parasite meurt avec la cellule, ce que traduit la formation de renflements et la diminution dans l'intensité de la coloration, sa dissémination par les nouvelles cellules ne peut plus se produire, les formes involutives qu'elles contiennent étant mortes. Nous avons cependant souvent observé, au delà des limites du capitule, quelques filaments de longueur variable,



plus ou moins altérés, et en voie de croissance. Ce sont précisément ces filaments qui peuvent s'implanter dans les cellules et devenir les germes de nouveaux nodules. Souvent aussi un filament d'un capitule renfermé dans une cellule s'accroît, avant que celle-ci dégénère, au delà des limites du protoplasma, et est saisi par un autre phagocyte qui peut le transporter ailleurs (fig. 9, *b*). Quelquefois ce phagocyte reste en place auprès du phagocyte primitif, devient ovale ou polygonal en s'agrandissant, pendant que le filament qu'il contient se développe et conserve ainsi ses connexions avec le capitule initial (fig. 8 et 9). C'est ainsi que s'explique le fait qu'un même capitule soit souvent contenu dans deux et même plusieurs cellules (voir Photogramme 3, pl. IX).

On voit d'après cela que le filament qui s'est introduit dans une cellule se développe, quoique lentement, en capitule (Photogr. 4). En même temps, ce filament subit des altérations qui prouvent que la cellule lutte avec le parasite. Si la cellule succombe, le parasite se développe et multiplie ses colonies. Si le parasite a le dessous, il donne ses renflements en massue, se colore peu ou pas, tandis que la cellule conserve la netteté de ses contours (fig. 10, 13, 14, 17, 18). En étudiant alors attentivement les coupes microscopiques avec l'Apochrom. de Zeiss (2 m. m. avec Oc. 8 et 12), on observe des capitules tout à fait incolores, en tout ou en partie, contenus dans de grandes cellules. Il y en a de disloqués en granules, filaments et renflements, dont les uns sont encore colorables et les autres non (fig. 18). Les contours de ces capitules sont parfois tellement confus qu'ils semblent confluer avec le protoplasma et qu'ils deviennent même tout à fait invisibles (fig. 12).

Il y a donc lutte entre le parasite et les cellules, et c'est pour cela que le champignon ne forme pas dans les tissus vivants les épais enchevêtrements avec riches ramifications dichotomiques que nous rencontrons dans les cultures d'*actinomyces*. L'intervention de la phagocytose nous explique aussi pourquoi le procès pathologique se limite et ne se généralise pas. Le parasite possède des propriétés chimiotactiques, et attire ainsi des phagocytes qui se transforment ensuite en cellules épithélioïdes. Dès les premiers signes de la dégénérescence du nodule, les éléments cellulaires qui le constituent s'infiltrant de leucocytes

multinucléés, qui augmentent en nombre, amènent la dégénérescence du nodule, et noient dans le pus les masses détritiques.

En outre de cela, dans les infiltrations actinomycotiques, nous trouvons des grains ronds, rares ou en grand nombre, libres ou rattachés par une substance intermédiaire, de grandeur variable, ayant l'aspect, dans leur forme typique, des globules hyalins. Ces formations se colorent fortement par la méthode de Gram, de même que le parasite, et ressemblent évidemment aux corps hyalins typiques.

Il y a donc dans le granulome actinomycotique, outre le parasite et les infiltrations de cellules épithélioïdes, de nouvelles formations tout à fait analogues aux corps hyalins (fig. 12, 13, 15, 16, 17). La connexité de ces corps avec les élargissements en massue des filaments du parasite n'est pas douteuse : ce sont ces renflements qui se détachent des filaments et se transforment en globules hyalins, lesquels sont ainsi le résultat de la dégénérescence de l'*actinomyces*.

Nous avons donc dans l'actinomycose un exemple bien instructif de la formation des corps hyalins : ils sont, comme dans le rhinosclérome (10), un produit de la dégénérescence du parasite. Dans l'actinomycose, les corps hyalins sont beaucoup plus petits et plus rares que dans le rhinosclérome, les groupes et les amas sont moins abondants, mais leur physionomie et leurs propriétés sont les mêmes.

En résumé, le pus des actinomycomes contient des cellules épithélioïdes dégénérées, des capitules parasitaires morts, avec leurs renflements en massue, des granules de dégénérescence du champignon, et des corpuscules puriformes multinucléaires avec des grains libres de chromatine.

Le champignon n'est donc entouré de leucocytes multinucléés que si les cellules épithélioïdes sont en voie de dégénérescence : en d'autres termes, l'infiltration de l'actinomycome par les leucocytes polynucléaires est un signe de la dernière période de la dégénérescence, au lieu d'être, comme on l'a admis, l'image constante de sa structure. De même nous n'avons pu constater la présence des cellules polynucléaires gigantesques, décrites par Marchand et d'autres, ni dans les nodules jeunes, ni dans ceux qui étaient complètement développés.



On peut conclure de même au sujet de la formation du parasite en dehors de la cellule, et quand on trouve des filaments libres, provenant d'un capitule inclus dans une cellule épithélioïde, et sortant à l'extérieur, ce n'est qu'un phénomène temporaire : ce filament est destiné à être repris par une cellule nouvelle et ne peut nullement se développer en dehors d'elle dans le tissu.

Voici donc comment se fait la multiplication du parasite dans l'organisme. Dès qu'un de ces éléments y a pénétré, n'importe comment, il s'entoure de phagocytes (leucocytes à un seul noyau et jeunes cellules du tissu conjonctif), qui se transforment en grandes cellules épithélioïdes contenant un nucléole, et s'emparent ensuite des bâtonnets isolés ou des groupes mycéliens. A ce moment la lutte commence et, si les cellules possèdent une vitalité suffisante, elles détruisent le parasite. Quand celui-ci l'emporte, il se développe, sort des limites de la cellule qui dépérit, et appelle de nouveaux phagocytes en vertu de son pouvoir chimiotactique. Ceux-ci font barrière autour du parasite, s'emparent de ses renflements terminaux, arrêtent son accroissement, et finissent par y provoquer les formes involutives et la dégénérescence régressive qui aboutit à la formation des corps hyalins (fig. 3, 4, 5, 10, 12, 13, 17 et 18). Ceux-ci, comme dans le rhinosclérome, sont un produit parasitaire.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. BOLINGER, Ueber eine neue Pilzkrankheit beim Rinde. (*Centralblatt für med. Wissensch.*, 1817, n° 27, et *Deutsche Zeitschr. für Thiermedizin*, t. III, 1877.)
2. ISRAEL, *Virchow's Arch.*, t. LXXIV, 1878, et t. LXXVII, 1879.
3. *Deutsche Zeitschr. für Thiermedizin*, t. VII, 1882.
4. *Beitrage zur Klin. Chirurg.*, éditées par Bruns, Tubingen, 1886.
5. Actinomycosis (*Eulenburg's Real Encyclopædie*, 2<sup>e</sup> édition).
6. ZEIGLER, *Beitrage zur pathol. Anatomie*, t. IX, 1890.
7. *Centralblatt für Chirurgie*, 1890, n° 22.
8. *Virchow's Archiv*, 1886, t. CV.
9. *Deutsche Zeitschr. für Chirurgie*, t. XXXV.
10. A. PAWLOWSKY. Sur l'étiologie et la pathologie du rhinosclérome. (*Verhandl. des X internation. Medicin Congresses*, Berlin, 1890, t. II.)
11. CORNIL et BABES. *Les bactéries*, 3<sup>e</sup> édition, 1890, pages 343 et 326.

# CILS COMPOSÉS

## CHEZ UNE BACTÉRIE TROUVÉE DANS LES SELLES D'UN CHOLÉRIQUE

PAR M. N. SAKHAROFF, DE TIFLIS.

(Avec la planche IX, fig. 1, 2 et 5.)

---

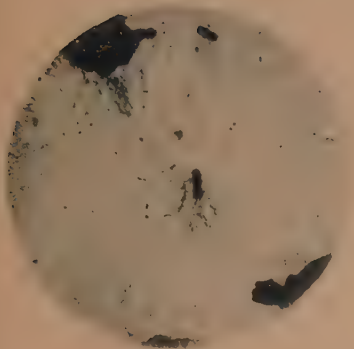
M. Loeffler, qui a proposé une méthode très répandue aujourd'hui pour la coloration des cils des bactéries, a décrit et reproduit dans le *Centralblatt f. Bact.* (n° 20, 1890) des cils spiralés très longs, rencontrés dans une culture de charbon symptomatique sur le sérum de sang. Il a recherché sans succès, chez d'autres bactéries, ces formes bizarres.

Comme je n'ai vu apparaître depuis aucun document nouveau sur ce sujet, je me décide à décrire des formes semblables chez un bacille que j'ai isolé l'été dernier des selles d'un cholérique, et que j'ai nommé *bacillus asiaticus*.

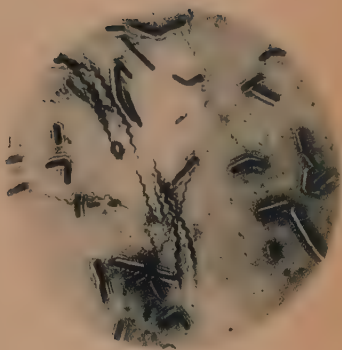
C'est un grand bacille mobile de  $4\ \mu$  et plus de longueur, sur  $1\ \mu$  d'épaisseur, à bouts arrondis, et formant quelquefois des longs fils et des chaînes. Dans leur intérieur, surtout chez les bacilles cultivés sur pommes de terre, on observe des granulations noires, en nombre variable, solubles dans l'huile de cèdre. Il n'y en a parfois qu'une seule à un bout, ou deux aux deux bouts. Cultivé en piqûre sur un tube de gélatine, le *bac. asiaticus* la liquéfie rapidement, en formant un entonnoir rempli d'un liquide trouble, couvert par une membrane blanchâtre. Sur plaques, il donne des colonies circulaires ou ovales jaunâtres, avec contour granuleux, d'où sortent plusieurs jets minces irrégulièrement disposés. La présence de ces jets et leur longueur semblent dépendre de la température et du degré de solidité de la gélatine. Il y a souvent des jets pareils autour du fond de l'entonnoir dans la culture par piqûre, ce qui fait ressembler celle-ci à une culture de bactériidie charbonneuse.

La culture sur gélose et pomme de terre donne une membrane blanchâtre, parfois jaunâtre, avec bords ondulés.

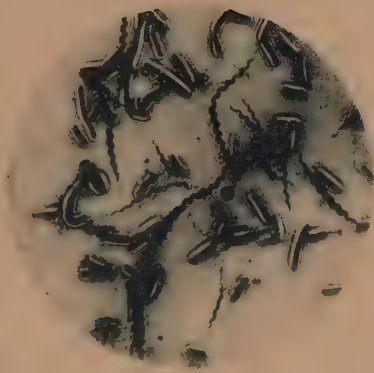




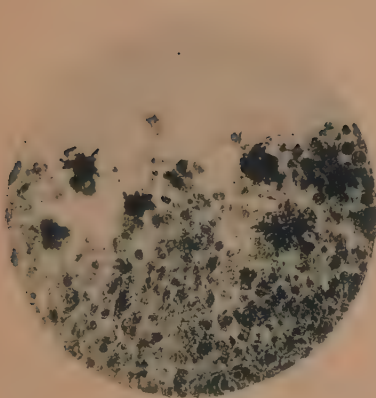
1



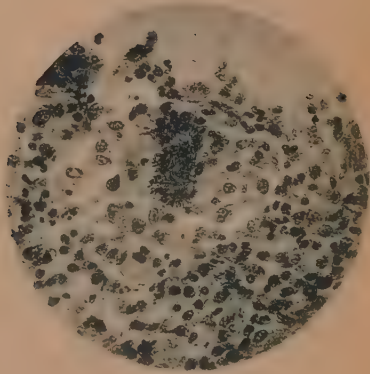
2



5



4



3



Les spores de ces bacilles sont grandes, ovales, et d'une teinte verdâtre. On peut les observer dans la membrane développée à la surface du bouillon, lorsque la température dépasse 20°.

Le *bac. asiaticus* est aérobic, et n'est pas pathogène pour le cobaye. Toutes ces propriétés le rapprochent en partie du *bac. ramosus* ou du *bac. megaterium*, mais il n'est identique à aucun d'eux.

Son intérêt principal résulte de la présence des cils spiralés mentionnés plus haut. On les observe facilement sans coloration dans le liquide trouble qui remplit l'entonnoir de culture sur la gélatine. Ils y sont parfois en grande quantité 24 à 36 heures après l'ensemencement, quand l'entonnoir n'a pas encore atteint les parois de l'éprouvette. Ils sont immobiles, leurs tours sont réguliers et identiques comme chez les spirochètes. Mais leur longueur et leur épaisseur sont très variables. Il y a des spirales courtes, à peine visibles, et des spirales plus épaisses que les bacilles même, et si longues qu'elles traversent tout le champ du microscope. Cette variabilité de dimensions prouve qu'elles sont composées, et cela devient évident à l'observation des préparations colorées, dans lesquelles on réussit à voir des spirales disloquées et effilochées. Les plus grosses spirales sont certainement formées de spirales minces.

Mais que représentent ces dernières ? Sont-elles des micro-organismes étrangers ayant poussé avec nos bacilles, ou sont-elles une de leurs formes évolutives ? La première supposition est inadmissible, car il n'est pas possible d'obtenir les bacilles sans spirales après une nombreuse série de cultures consécutives sur plaques de gélatine. Il faut rejeter aussi la seconde hypothèse, parce qu'on rencontre ces spirales très tôt, déjà 24 heures après l'ensemencement.

Il faut donc accepter, comme la plus probable, l'hypothèse de Loeffler, qui voit dans ces spirales des ficelles composées de cils. Une étude plus approfondie rend cette explication plus certaine. Les très jeunes cultures du *bac. asiaticus* sur gélatine présentent souvent des groupes de bacilles évidemment réunis par leurs cils, puisqu'ils ne peuvent pas se séparer, bien qu'ils s'agitent beaucoup. Les bacilles libres sont visiblement attirés par ces groupes. Ils se dirigent vers eux et s'y attachent ou s'en séparent après les avoir touchés. Je me suis convaincu, en observant avec



soin ce phénomène, que dans cette rencontre ces bacilles perdent leurs cils, dont l'ensemble forme les spirales. Sur les préparations incolores, on ne voit pas ces spirales au début de leur formation, mais seulement quand elles ont grossi par l'apport des cils détachés. On rencontre des spirales encore unies avec des bacilles, qui n'ont pas eu le temps de s'en séparer.

Ces spirales n'absorbent pas les couleurs d'aniline les plus fortes; elles ne s'en imbibent qu'après l'action des mordants. Comme elles sont visibles à l'état incolore, elles sont très commodées pour étudier les détails de la coloration des cils. La méthode de Loeffler leur est inapplicable, attendu que ces cils composés (*cilia composita* : c'est ainsi que je les nomme pour les distinguer des cils simples qui les forment) ne se produisent que sur la gélatine. Le mélange de Loeffler, tanin avec sulfate de fer acidulé, colore si fortement la gélatine que les cils y disparaissent. Je n'ai pu obtenir de bons résultats qu'en affaiblissant l'action du sulfate de fer acidulé, pris en solution saturée à la température ordinaire. Ce mordant pénètre d'abord la gélatine, puis les cils; si donc nous le laissons agir seulement une demi-minute, et si nous colorons ensuite par la solution de fuchsine d'Ehrlich, les cils composés resteront incolores et bien visibles sur le fond rouge de la préparation.

Ces mêmes cils, qui absorbent le mordant plus lentement que le fond, le retiennent aussi plus longtemps pendant les lavages. Laissons donc agir ce mordant pendant 5 à 10 minutes, sur la préparation légèrement chauffée, lavons rapidement avec de l'eau et colorons par la fuchsine d'Ehrlich : nous verrons les cils bien visibles sur le fond faiblement coloré de la préparation. Mais il faut que le lavage soit prompt et que la préparation soit rapidement desséchée par le courant d'air d'un insufflateur.

Les préparations ainsi obtenues montrent des cils beaucoup plus nombreux que les préparations incolores. On en trouve presque sur chaque champ, avec les dimensions les plus diverses; les uns plus gros que les bacilles, d'autres plus fins, qui sont peut-être les cils primitifs.

Sur l'indication de M. Loeffler, je suis arrivé à colorer ces cils primitifs par une autre méthode. Comme les cultures du *bac. asiaticus* ont une réaction alcaline, j'ai ajouté au mordant de Loeffler une demi-goutte d'une solution d'acide sulfurique

à 1 0/0. C'est ce mordant qui m'a donné la coloration la plus intense. Il est à noter que c'est aussi celui qui colore le mieux les cils des vibrions du choléra.

Sur les préparations ainsi colorées, on peut voir que les cils du *bac. asiaticus* sont longs et nombreux, ce qu'on pouvait prévoir. Autour des bacilles sont beaucoup de cils détachés, en forme de spirales minces. J'ai eu beau y mettre du soin, je n'ai jamais réussi à éviter ce détachement, et à obtenir des préparations avec les cils adhérents, ce qui témoigne qu'ils sont plus délicats et plus fragiles que ceux des autres microbes mobiles. Peut-être la formation des cils composés s'explique-t-elle par cette particularité, mais il reste à expliquer pourquoi leur réunion a lieu en spirales régulières.

Il reste aussi à voir si ce microbe se rencontre souvent chez les cholériques, et s'il a quelque relation avec le choléra. Plusieurs médecins du Caucase ont signalé la présence fréquente de spirales dans les selles des cholériques, mais ce n'est que si le choléra apparaît de nouveau dans nos régions qu'on pourra étudier ces questions.

Explication des figures 3, 4 et 5 de la Pl. IX.

Fig. 1. — *Bacillus asiaticus* avec ces cils. Autour de lui sont plusieurs cils détachés. Culture sur gélose. Coloration par la méthode de Loeffler.

Grossissement =  $\frac{1}{1,200}$

Fig. 2 et 5. — Cils composés dans les cultures du *bac. asiaticus* sur la gélatine. Coloration par la méthode de Loeffler modifiée. Grossis. =  $\frac{1}{800}$ .

Microscope à immersion à l'huile de Winkel, système  $\frac{1}{24}$ .

# TECHNIQUE DE LA COLORATION DES CILS;

CILS DES VIBRIONS CHOLÉRIQUES ET DES ORGANISMES VOISINS,  
CILS DU B. TYPHIQUE ET DU B. COLI.

PAR MM. M. NICOLLE ET V. MORAX.

(Travail du laboratoire de M. le Dr ROUX à l'Institut Pasteur.)

---

## I

Parmi les divers procédés de coloration des cils, seul celui de Löffler est d'une application générale. Le voici, résumé en peu de mots.

On sème sur gélose le microbe qu'il s'agit d'étudier et l'on porte à l'étuve. Dès que la culture est nettement développée, on en prélève une parcelle qu'on délaye dans une goutte d'eau à la surface d'une lamelle propre. Avec cette première dilution, on en pratique un certain nombre d'autres, toujours sur des lamelles. Celles-ci sont séchées à l'air et à l'abri de la poussière. Puis on fixe les préparations en les passant trois fois dans la flamme, et l'on procède à la coloration qui comprend deux temps : le mordantage et la coloration proprement dite.

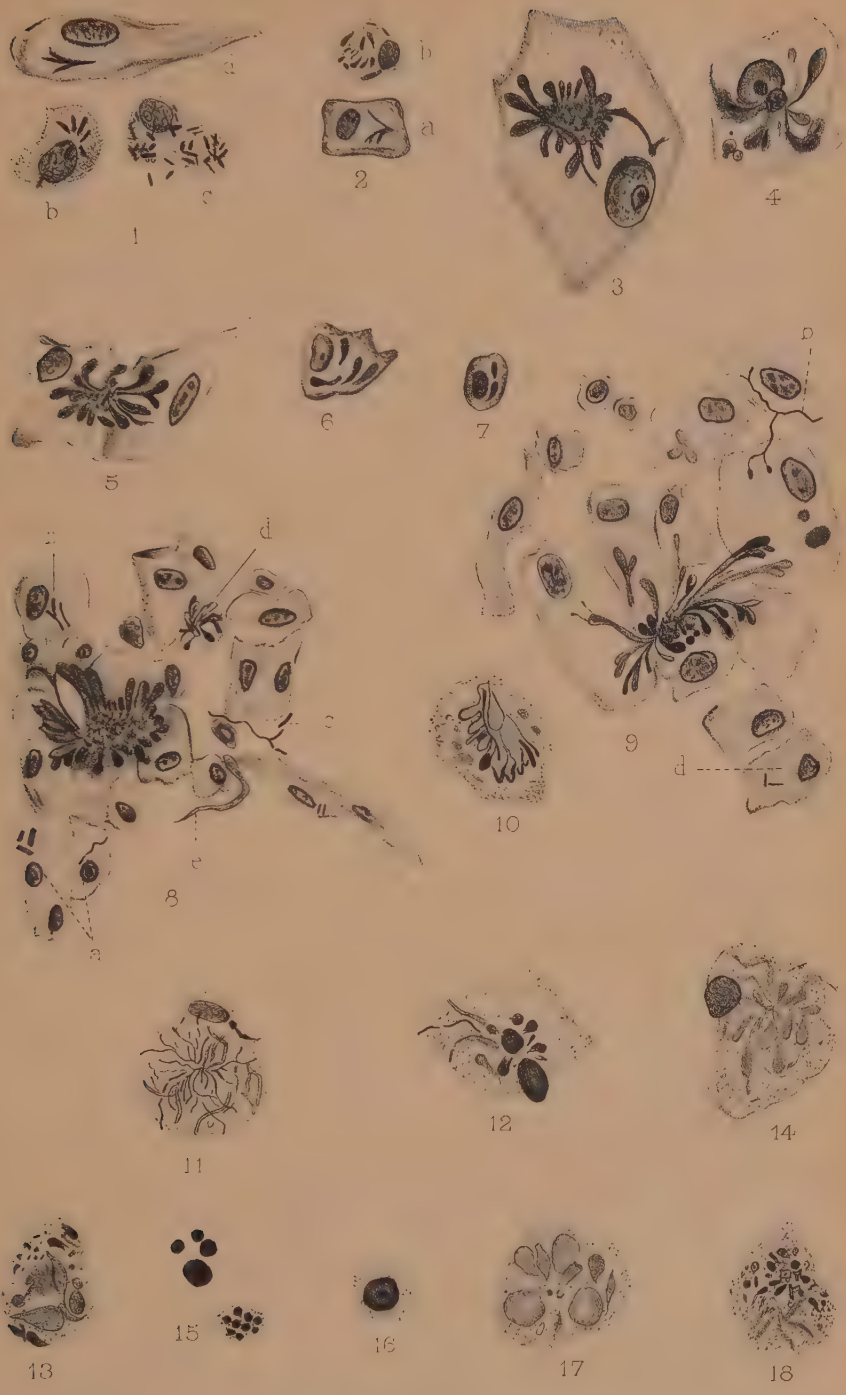
Le mordantage, opération absolument indispensable, s'obtient à l'aide de l'encre de fuchsine ainsi composée :

Solution aqueuse de tanin à 20 pour 80 . . . . .	40 c. c.
Solution aqueuse de sulfate ferreux saturée à froid . . .	5 c. c.
Solution saturée de fuchsine dans l'alcool absolu . . .	1 c. c.

La coloration se fait avec une solution saturée de fuchsine dans l'eau d'aniline, à laquelle on a ajouté peu à peu quelques gouttes de soude à un pour mille jusqu'à opalescence commençante.

Pour mordancer, on verse sur la lamelle tenue dans une pince une goutte d'encre de fuchsine, et l'on chauffe au-dessus d'une petite flamme pendant une demi à une minute en éloignant et rapprochant alternativement le couvre-objet. Il ne faut pas en effet





Pawlowsky del.

V. Roussel lith.



atteindre l'ébullition, la température à laquelle le mordant émet des vapeurs étant suffisante. On lave ensuite à l'eau distillée et à l'alcoolabsolu; puis on colore en déposant à la surface de la lamelle une goutte de fuchsine anilinée alcaline, et en chauffant avec précaution pendant une minute. Enfin on lave une dernière fois à l'eau, on laisse sécher et l'on monte dans le baume.

Mais ce n'est pas tout. Suivant l'espèce bactérienne à laquelle on a affaire, il faut, d'après M. Löffler, modifier la réaction du mordant en l'additionnant d'un nombre déterminé de gouttes d'alcali (soude à 1 0/0) ou d'acide (acide sulfurique à 1,225 0/0), nombre constant pour chaque microbe. Nous n'indiquerons pas ici tous ces nombres, la question n'ayant plus d'importance aujourd'hui. Il nous suffira de rappeler que les divers vibrions (v. cholérique, v. de Finkler et Prior, v. Metchnikovi), le bacille pyocyanique, et plusieurs variétés connues de spirilles nécessite l'addition d'acide à l'encre de fuchsine — et qu'inversement les bacilles typhiques, le *b. subtilis*, les *b.* de l'œdème malin et du charbon symptomatique, le *micrococcus agilis*, etc..., ne montrent leurs flagella que grâce à un mordant alcalinisé. Un seul organisme, parmi ceux que M. Löffler a étudiés, possède des cils dont le mordant pur et simple suffit à révéler l'existence: c'est le *spirillum concentricum*.

La méthode qui vient d'être exposée, tout en constituant un grand profit dans l'étude morphologique des bactéries, est donc malheureusement trop complexe pour être rapidement apprise et facilement répétée. Aussi y avait-il intérêt à la simplifier sans lui faire perdre sa généralité. C'est ce que nous nous sommes attachés à faire depuis près de deux ans.

Tout d'abord nous avons remarqué que la quantité d'alcali ou d'acide indiquée comme nécessaire au bon mordantage d'un microbe donné n'avait absolument rien de précis. Par exemple le bacille typhique qui exige, d'après M. Löffler, l'addition de 1 c. c. de soude à 1 0/0, à l'encre de fuchsine, montre des cils tout aussi bien colorés quand on abaisse la proportion d'alcali à 15, 10 et même 8 gouttes d'une pipette qui débite 40 gouttes au centimètre cube. Le même fait s'est présenté pour d'autres organismes appartenant aux deux séries établies par M. Löffler. Cet auteur avait déjà vu du reste que les cils du bacille du lait bleu se mordantent à peu près indiffé-



remment dans l'encre de fuchsine acidifiée (10 gouttes) ou alcalinisée (15 gouttes).

Si nous avons pu obtenir d'excellents résultats sans nous conformer exactement aux prescriptions de M. Löffler, c'est que la réaction du mordant ne représente qu'un des facteurs de la coloration des cils. Cette réaction reste d'ailleurs acide même après addition de plus d'un centimètre de soude à 1 0/0 (pour 16 c. c. d'encre de fuchsine). Le temps pendant lequel on fait agir la fuchsine anilinée et surtout le mordant, ainsi que la température atteinte lors de ces deux opérations, constituent en réalité les éléments essentiels de la méthode. Aussi avons-nous pu avec deux solutions d'encre de Löffler, l'une légèrement acidifiée, l'autre légèrement alcalinisée, colorer les flagella d'un certain nombre de microorganismes. Il nous suffisait pour obtenir de bons résultats de mordancer à plusieurs reprises et de chauffer un peu fortement.

Encouragés par ces résultats, nous avons déjà tenté de supprimer complètement l'usage de l'acide et de l'alcali dont le rôle nous paraissait de plus en plus problématique, lorsque nous avons appris que cette suppression était déjà en usage dans certains laboratoires. Quelques recherches nous ont bientôt démontré que l'encre de fuchsine pure et simple suffisait en effet pour mordancer les cils des divers microbes mobiles.

La méthode de M. Löffler se trouvant ainsi fort simplifiée, nous avons cherché à éviter un certain nombre d'inconvénients inhérents à une technique aussi minutieuse. Il nous a d'abord paru nécessaire de modifier le mode de préparation des lamelles. Pour pratiquer la dilution des microorganismes, nous prenons une petite quantité de culture récenté sur gélose et nous l'agitions dans un verre de montre rempli d'eau ordinaire (préférable, comme l'a montré M. Löffler, à l'eau distillée), de manière à obtenir une suspension à peine trouble et absolument homogène. Lorsque celle-ci est préparée, nous en mettons une goutte à la surface d'une lamelle propre. La lamelle doit avoir été fortement flambée auparavant, sinon le liquide ne s'y répand pas également et se rassemble en gouttes isolées, soit immédiatement, soit après peu d'instant.

Notre procédé de dilution et d'étalage des lamelles a pour but d'obtenir des organismes isolés avec leurs cils intacts. Il a

aussi pour but de n'entraîner avec les bactéries que le moins possible de ces matières muqueuses qui les agglomèrent dans les cultures sur milieu solide et qui forment des précipités, souvent abondants lors de la coloration. Les lamelles une fois préparées, il est inutile de les fixer dans la flamme (ou autrement).

Nous nous sommes occupés également du mordant et du mordantage. L'encre de fuchsine constitue une solution excellente et à laquelle il n'y a rien à changer. Elle doit être préparée avec du tanin à l'éther de très bonne qualité, si l'on ne veut s'exposer à échouer complètement dans ses recherches; c'est là un point très important.

Le mordantage doit être répété trois ou quatre fois en chauffant chaque fois pendant une dizaine de secondes, de manière à ne pas dépasser la simple apparition de vapeurs à la surface du liquide. Entre chaque mordantage, il faut laver soigneusement la lamelle. Si l'on chauffe, en effet, trop fort ou pendant trop de temps lors de chaque mordantage partiel, et si on lave insuffisamment la lamelle, on est sûr d'obtenir d'abondants précipités.

Ceux-ci, avons-nous dit, sont dus à la présence de certaines substances glutineuses qui agglomèrent les microbes. Il est possible, par une dilution suffisante, d'en réduire la quantité, mais il s'en trouve toujours, cependant, sur les lamelles. Ces substances se colorent un peu plus difficilement que les cils; aussi faut-il attendre un degré de mordantage tel que, seuls, les flagella aient acquis de l'affinité pour la fuchsine. C'est là le point vraiment difficile dans la coloration des cils. Si l'on ne mordance pas suffisamment, les lamelles, exemptes de précipités, montrent des microbes bien teintés, mais pas de cils appréciables. Si l'on mordance trop, cils très nets, au contraire, mais précipités abondants, obscurcissant souvent toute la préparation. Nous croyons qu'en suivant nos indications on arrivera assez facilement à trouver le degré convenable de mordantage. Il faut, d'ailleurs, savoir qu'on réussit rarement à obtenir une préparation excellente dans toutes ses parties, à moins de faire des dilutions très étendues.

La coloration proprement dite ne joue qu'un rôle secondaire. On réussit aussi bien avec la fuchsine créosotée ou phéniquée, avec le violet de gentiane aniliné ordinaire ou même le violet

aqueux, qu'avec la solution préconisée par M. Löffler. Nous nous servons, pour notre part, du liquide de Ziehl, qu'on a toujours sous la main dans les laboratoires et qui demeure longtemps sans s'altérer. Pour colorer, nous chauffons une ou deux fois pendant un quart de minute. Si la dilution n'est pas très étendue et si nous croyons avoir un peu trop mordancé, il vaut mieux ne chauffer qu'une seule fois. Dans le cas contraire, on peut chauffer deux fois, même assez fortement, car le colorant n'engendre jamais par lui-même de précipités.

M. Löffler conseille de laver la préparation à l'alcool absolu entre le mordantage et la coloration. Ce lavage nous a toujours paru rendre la coloration plus difficile en enlevant la fuchsine déjà fixée sur les cils; aussi l'avons-nous abandonné dès le début.

En résumé, voici comment nous conseillons de procéder : Prendre une parcelle de culture récente sur gélose et la diluer dans un verre de montre rempli d'eau ordinaire, de manière à obtenir un liquide à peine trouble. — Répartir ce liquide avec une pipette à la surface de lamelles propres et fortement flambées par des passages réitérés dans la flamme chauffante d'un bec Bunsen. On tient ces lamelles par un de leurs angles à l'aide d'une pince de Cornet. Le liquide étant étalé sur toute l'étendue, les incliner et aspirer avec la pipette l'excès de la dilution qui se rassemble au niveau de l'angle inférieur. — Laisser sécher à l'abri de la poussière. — Déposer à la surface d'un des couvre-objets une grosse goutte d'encre de fuchsine et chauffer une dizaine de secondes sur une petite flamme (flamme veilleuse d'un bec Bunsen, par exemple). — Lorsque des vapeurs apparaissent, jeter le mordant, incliner la lamelle et faire tomber sur l'angle supérieur le jet d'une pissette pour bien laver la préparation sans détacher la couche de microbes. — Recommencer encore deux ou trois fois le mordantage et les lavages. Avoir soin, après chaque lavage, d'essuyer la face inférieure du couvre-objet et l'extrémité de la pince de Cornet; sans quoi, lors du mordantage suivant, l'encre de fuchsine s'écoulerait sous la lamelle et le long de la pince. — Colorer en versant la fuchsine de Ziehl à la surface de la préparation et en chauffant une ou deux fois pendant un quart de minute. — Laver une dernière fois à l'eau et examiner dans ce liquide. Si la coloration est réussie,



faire sécher la lamelle et monter dans le baume au xylol.

Telle est la méthode que nous employons constamment et qui nous donne de bons résultats. Elle est assez simple pour que les élèves qui suivent les cours de l'Institut Pasteur aient toujours pu obtenir rapidement avec elle des préparations satisfaisantes.

## II

À l'aide de notre procédé nous avons étudié, dans ces derniers temps, les cils des vibrions cholériques et des organismes voisins. Les premiers comprenaient divers échantillons : vibrions de Shanghai, de Calcutta, de Massaouah, de Hambourg, de Courbevoie, d'Angers, de Paris (épidémie de 1884), vibron indien provenant du laboratoire de M. Koch, et vibron de Finkler et Prior. Les seconds étaient représentés par le *vibrio Metchnikovi*, le vibron de Deneke et cinq vibrions isolés de l'eau de Seine, l'un par M. Blachstein, les autres par M. Sanarelli.

Tous ces organismes étaient mobiles, à l'exception du vibron indien. Ce dernier, examiné à plusieurs reprises en prenant les autres comme témoins, s'est toujours montré privé de cils. Les autres, constamment pourvus de flagella, se sont présentés sous deux types morphologiques très différents.

Le premier type est caractérisé par la présence d'un cil unique situé à l'une des deux extrémités du vibron. C'est le cas des vibrions cholériques de Shanghai, Hambourg, de Courbevoie, d'Angers; du v. de Finkler et Prior, du v. de Deneke, et des v. de MM. Sanarelli et Blachstein. M. Löffler avait déjà vu que le v. *Metchnikovi*, le v. de Finkler et Prior, et le v. cholérique qu'il avait entre les mains ne possédaient qu'un seul cil. MM. Neuhauss et Trenkmann étaient arrivés au même résultat par des méthodes différentes. Enfin M. Straus avait fait pareille constatation à l'aide de son procédé de coloration des cils des vibrions vivants.

Le second type, qui comprend les vibrions cholériques de Massaouah, de Calcutta et de Paris (1884), est caractérisé par la présence de quatre cils situés d'ordinaire deux par deux à chaque extrémité. Parfois trois cils occupent un des bouts de l'organisme et un seul l'autre bout; exceptionnellement les quatre flagella sont massés à un seul pôle. Jamais nous n'avons constaté un



Fig. 1. Fièvre typhoïde. — 2. *Bac. coli*. — 3. B. de Finkler et Prior. — 4. B. de Deneke. — 5. *V. avicida*. — 6. *V. de Sanarelli* (Suresnes). — 7. *V. cholérique* (Angers). — 8. *V. cholérique* (Courbevoie). — 9. *V. cholérique* (Hambourg). — 10. *V. cholérique* (Shang-Haï). — 11. *V. cholérique* (Massaouah, forme ronde). — 12. *Id.* (forme allongée). — 13. *V. cholérique* 1884. — 14. *V. cholérique* indien. — 15. *V. cholérique* (Calcutta).

plus grand nombre de cils. Par contre, beaucoup d'individus n'offrent pas leurs cils au complet, fait qui n'a rien d'étonnant pour qui connaît par expérience la fragilité de ces organes. M. Löffler a beaucoup insisté sur cette particularité, notamment à propos du seul coccus mobile actuellement connu, le *micrococcus agilis* qui, bien que muni de plusieurs flagella, n'en montre cependant d'ordinaire qu'un seul.

Ces deux types différents se retrouvent dans les cultures successives et ne sont pas modifiés par le passage à travers l'organisme des animaux et de l'homme. Il s'agit donc d'un caractère paraissant assez constant pour avoir une certaine valeur.

Il est intéressant en particulier de constater des différences morphologiques aussi marquées chez des vibrions isolés de cas de choléra typique en divers endroits et à diverses dates, vibrions analogues d'autre part par leurs caractères de culture et leur action pathogène.

Dans les vieilles cultures, où les vibrions affectent ces aspects en boule décrits jadis par M. Hüppe, et considérés par lui comme répondant à des formes de résistance, on retrouve encore nombre de flagella même après un mois, dans les vibrions des deux groupes.

Tout en tenant compte du pléomorphisme bien connu des vibrions, il convient de faire remarquer que les vibrions uniciliés sont d'ordinaire plus courts et plus virgulaires que les vibrions pluriciliés.

### III

Les cils du *b. coli* et du *b. typhique* ont attiré notre attention depuis longtemps. Voici ce que des examens répétés et variés nous ont montré. Le *b. coli* possède toujours moins de flagelles que le *b. typhique*, le maximum est d'ordinaire 6, exceptionnellement 8 ou 10. Dans le *b. typhique*, au contraire, les flagella sont toujours plus abondants, et il est fréquent d'en rencontrer 10 ou 12. D'autre part, les cils du *b. coli* sont bien plus fragiles que ceux du *b. typhique*. En somme, il nous semble facile de reconnaître les deux organismes lorsque leurs flagella ont été colorés dans les mêmes conditions ; il serait moins aisé de distinguer une culture jeune de *b. coli* d'une culture ancienne de *b. typhique*.



# RECHERCHES SUR LE CHOLÉRA ET LES VIBRIONS

PAR EL. METCHNIKOFF

## DEUXIÈME MÉMOIRE SUR LA PROPRIÉTÉ PATHOGÈNE DES VIBRIONS

### I

#### APERÇU DES DERNIÈRES ACQUISITIONS SUR LA MICROBIE DU CHOLÉRA.

Les méthodes perfectionnées, qui permettent de mettre en évidence le bacille virgule, ont en même temps appris qu'il est souvent très difficile de distinguer ce microbe d'autres vibrions. Grâce à ces mêmes méthodes, le nombre des vibrions cultivables sur gélatine s'est beaucoup accru. On en a trouvé plusieurs dans les déjections humaines et dans l'eau. Rien que dans l'*Institut pour l'étude des maladies infectieuses*, à Berlin, on a découvert dans l'eau presque une douzaine d'espèces vibrioniennes.

On comprend facilement que dans ces conditions le diagnostic du bacille virgule devient de plus en plus difficile. Tandis que le diagnostic bactériologique de la tuberculose, de la pneumonie fibrineuse et de tant d'autres maladies peut être fait par chaque bactériologue, la détermination du bacille virgule dans les déjections et dans l'eau réclame de plus en plus des savants particulièrement exercés. M. Flugge<sup>1</sup> avoue, dans une récente publication, que la distinction entre le bacille virgule et les espèces voisines n'est pas du tout chose facile. Les différences se bornent quelquefois (comme avec le *Vibrio Metchnikovi*) au degré de virulence pour certains animaux d'expérience. M. Koch<sup>2</sup> conseille à qui n'est pas maître dans le diagnostic du choléra de renoncer à ce travail. En effet, la publication où

1. *Zeitschr. f. Hyg.*, V, XIV, 1893, p. 189.

2. *Ib.*, p. 338.

M. Koch donne ce conseil démontre de la façon la plus claire les difficultés considérables qu'on doit surmonter. Les caractères qui étaient autrefois signalés comme spéciaux au bacille virgule, tels que la forme des bactéries, leur mobilité, leur manière de végéter dans la gélatine, ne suffisent plus maintenant. M. Koch décrit lui-même un cas de choléra dans lequel les bacilles virgules liquéfiaient si peu la gélatine que les colonies se présentaient sous forme de boucliers. D'un autre côté, dans le vibrion de Massaua, nous avons un exemple d'un bacille virgule qui liquéfie la gélatine beaucoup plus que les formes typiques. Aussi M. Koch abandonne comme inutiles les cultures par piqûre dans la gélatine. L'examen des gouttes suspendues devient également très peu important, parce qu'il a été démontré que des bacilles virgules incontestables peuvent être complètement dépourvus de mobilité, tandis que d'autres vibrions peuvent être très mobiles.

La forme des vibrions est de même très variable. A côté des vibrions recourbés et épais, on trouve des formes sveltes et minces, quelquefois à peine incurvées. M. Friedrich<sup>1</sup> a signalé une variété (Shanghai) qu'on pourrait confondre avec un vrai bacille et une autre (Malte) qu'on prendrait plutôt pour un coccobacille.

M. Friedrich a aussi décrit les différences que présentent les colonies développées sur les plaques de gélatine. En réalité, ces différences sont encore plus marquées. On trouve des bacilles virgules qui liquéfient la gélatine à 10 0/0 et très ferme, beaucoup plus que les formes ordinaires, et donnent des entonnoirs remplis d'une masse de culture uniformément trouble.

N'attachant plus qu'une valeur diagnostique secondaire à tous ces caractères, M. Koch, dans son nouveau mémoire, insiste surtout sur la réaction de l'indol et sur la virulence pour les animaux. Mais ces deux caractères sont tout aussi peu stables que les précédents. La coloration rouge que prennent les cultures de bacilles virgules dans de l'eau peptonisée alcaline, lorsqu'on ajoute un acide, présente une grande variabilité. A côté de races qui donnent une coloration rose très prononcée, il y en a d'autres, qui sont des vibrions cholériques incontestables,

1. *Arbeit. d. Kais. Gesundheits.*, 1892.

et qui, dans les mêmes conditions, ne donnent presque pas la réaction de l'indol. D'un autre côté, le vibron de Gamaleïa (*V. Metchnikovi*), que M. Koch a eu tort d'exclure de son examen, présente la même coloration rose-solférino qui est propre à plusieurs variétés du bacille virgule.

Mais, de tous les caractères, celui qui offre la moindre stabilité est sûrement la virulence. M. Koch ne se décide à reconnaître un vibron comme cholérique que dans les cas où il présente, à côté de la réaction de l'indol, une virulence considérable pour le cobaye. Or, dans ces conditions on peut accepter comme cholérique le vibron de Gamaleïa, et refuser la nature cholérigène à des vibrions assurément cholériques, mais dépourvus de virulence pour les animaux de laboratoire. Les expériences que nous relaterons dans ce mémoire prouvent le danger d'une pareille interprétation.

Les détails fournis dans le manuel de M. Petri<sup>1</sup> ne permettent pas non plus de distinguer le vibron du choléra d'une façon précise et nette. Après avoir indiqué la grande analogie de celui-ci avec le vibron de Gamaleïa, M. Petri croit pouvoir les distinguer par la plus grande liquéfaction de la gélatine et le trouble homogène des colonies sur plaques du *V. Metchnikovi*. Mais certaines variétés du vibron cholérique, telles que le *v. de Massaua*, présentent les mêmes particularités au point de vue de la croissance sur gélatine.

On savait déjà depuis longtemps que l'organisme de l'homme et des animaux renferme un grand nombre de spirilles et de vibrions variés, plus ou moins analogues au bacille virgule. Mais on se contentait toujours de signaler comme différence essentielle que ces microbes ne poussent pas sur les milieux nutritifs ordinaires. Il ne faut pas oublier cependant que la croissance des vibrions, mélangés avec d'autres bactéries, présente de grandes variations. Au début du choléra, le bacille virgule pousse si bien sur la gélatine qu'il envahit les plaques entières. A la fin de la maladie, c'est lui, au contraire, qui cède la place à d'autres microbes. On observe quelquefois que le vibron cholérique se développe encore assez bien sur des milieux spécialement appropriés, mais, semé sur gélatine, il refuse de pousser.

1. *Der Choleracurs*. Berlin, 1893, p. 32.



Lorsqu'on sème les déjections non cholériques sur des plaques de gélatine, ce sont surtout les *bacillus coli* et d'autres microbes non liquéfiant qui se développent. Mais les mêmes déjections, abandonnées pendant des semaines et semées ensuite, donnent naissance à un grand nombre de bactéries liquéfiantes. Parmi ces dernières, il se rencontre des vibrions recourbés, liquéfiant même la gélatine moins que le bacille virgule typique, et présentant en général la plus grande analogie avec le vibrion cholérique. Ainsi nous avons retiré des déjections d'une personne bien portante, sujette à la constipation habituelle, des vibrions très semblables au bacille virgule de Koch. Dans ce cas, il ne pouvait être question d'un rapport quelconque avec le choléra. Les déjections avaient été provoquées par un purgatif, et cela à Paris, en hiver, en dehors de toute épidémie cholérique, chez une personne qui ne buvait que de l'eau minérale ou de l'eau stérilisée, et qui n'avait en aucune façon affaire avec le choléra.

Il paraît que la même trouvaille a été faite à l'Institut de M. Koch. A la fin de son mémoire sur le diagnostic du choléra, nous trouvons le passage suivant : « Dans les déjections humaines, ces vibrions paraissent être extrêmement rares et ne se trouvent probablement jamais en grande quantité. » Il s'agit de vibrions que leurs cultures sur gélatine et gélose rapprochent de ceux du choléra, mais qui ne donnent pas la réaction de l'indol et ne sont pas pathogènes pour les animaux. Comme ces deux caractères ne sont pas du tout différentiels, on voit bien la difficulté que peuvent présenter ces cas au point de vue du diagnostic.

Plus fréquente encore est la rencontre de semblables vibrions dans les eaux. Comme il n'existe pas de moyens sûrs et faciles pour les séparer en espèces, l'arbitraire peut se glisser facilement dans l'interprétation de leur valeur étiologique.

Somme toute, la différenciation du vibrion cholérique, si facile dans les cas ordinaires, peut présenter cependant, dans des cas particuliers, des difficultés très grandes. *Dans l'état actuel de la bactériologie, les vibrions ne se présentent pas comme des espèces bonnes et bien définies, mais forment un groupe de formes très variable et bigarré, dans lequel il est souvent très difficile de s'orienter.*

## II

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DU *VIBRIO TYROGENUS* (DENEKE).

Beaucoup de fromages sont un terrain favorable au développement de vibrions très semblables au bacille virgule. Cette découverte a été faite par M. Deneke <sup>1</sup> à Göttingen, qui trouva dans un vieux fromage un vibron dont la forme et les cultures présentaient une grande analogie avec le microbe cholérique. Dans les traités de bactériologie, on insiste sur la forme ronde des jeunes colonies sur plaques de gélatine, qui serait distinctive du vibron de Deneke. Mais ce caractère n'a pas plus d'importance que celui tiré de la liquéfaction de la gélatine, liquéfaction plus prononcée avec ce vibron qu'avec le bacille virgule de Koch. L'absence de la coloration rouge (réaction de l'indol) est aussi citée comme caractère différentiel pour le vibron de Deneke.

Parmi les fromages que j'ai étudiés, le Brie surtout se distingue par l'abondance des vibrions dans son écorce rouge si caractéristique. J'y ai trouvé deux formes, une qui donna des colonies brunes liquéfiant la gélatine beaucoup moins que le vibron de Deneke, et aussi sensiblement moins que beaucoup de variétés de vibrions du choléra; et une autre à colonies jaunes, qui liquéfient la gélatine comme le v. de Deneke. Les jeunes colonies sur plaque de la variété brune ont des contours ondulés et sous tous les rapports ressemblent au bacille virgule.

Comme l'intoxication par le fromage n'est pas du tout chose rare, il était naturel de se demander si elle n'est pas due au développement de vibrions pathogènes. Et cela d'autant plus que le tableau clinique de cette intoxication ressemble singulièrement à celui du choléra. Vomissements, diarrhée aqueuse, crampes constituent les symptômes communs aux deux maladies <sup>2</sup>. Dans un fromage toxique de Livourne, M. Malenchini <sup>3</sup> a trouvé, entre autres bactéries, le vibron de Deneke.

Le fait que le vibron de Deneke est pathogène pour les animaux rend encore plus probable l'hypothèse de son rôle dans

1. *Deutsche medic. Wochenschr.*, 1885.

1. V. pour les cas d'intoxication par le fromage les *Schmidl's Jarbücher*, 1838, t. 19, p. 238; 1839, t. 21, p. 162; 1842, t. 34, p. 133; 1851, t. 69, p. 170; 1863, t. 120, p. 299; 1885, t. 208, p. 116; 1887, t. 213, p. 248.

2. *Bolletino chimico pharmac.*, 15 octobre 1892.

l'empoisonnement par le fromage. Il a été constaté à plusieurs reprises que ce microbe, introduit dans l'estomac de cobayes d'après la méthode de Koch (alcalinisation préalable et injection intrapéritonéale d'opium), provoque une maladie mortelle. M. Hüppe <sup>1</sup> a pu donner la maladie mortelle à des cobayes en leur injectant des cultures du v. de Deneke dans le péritoine.

Tout récemment, M. Kasanky <sup>2</sup> a établi que le vibron de Deneke est pathogène pour le pigeon. Une culture dans du bouillon, injectée dans le muscle pectoral à la dose de 1 c. c., tue le pigeon avec des phénomènes de septicémie.

Dans mes expériences, le vibron de Deneke, cultivé depuis plusieurs années dans le laboratoire, et provenant en dernière instance de la culture originale de M. Deneke, s'est montré virulent pour le cobaye et le pigeon. Un cobaye de 350 grammes est mort en six heures à la suite de l'injection, dans le péritoine, du liquide trouble, obtenu en délayant dans un peu d'eau une demi-culture sur gélose, faite à 36° et âgée de 20 heures. L'exsudat péritonéal abondant renfermait une masse de vibrions libres et mobiles, et ne contenait que peu de leucocytes. Un quart de la même culture, injecté dans la cavité abdominale, a également tué un cobaye de 355 grammes, mais la mort est survenue plus tard et les phénomènes de la réaction phagocytaire étaient beaucoup plus manifestes que dans le premier cas.

L'injection du vibron dans les muscles de la cuisse de cobayes provoque une tuméfaction considérable sans, toutefois, amener une maladie grave ou la mort des animaux. L'introduction de 7/8 d'une culture de vibron de Deneke sur gélose dans la veine auriculaire d'un lapin n'a pas été suivie d'effet. Par contre, une culture sur gélose, injectée dans le muscle pectoral d'un pigeon, a provoqué une septicémie, terminée par la mort au bout de 7 heures.

Afin d'établir si le vibron de Deneke, dont la virulence pour les animaux se rapproche de celle du bacille virgule, était pathogène pour l'homme, j'ai fait l'expérience suivante. Après avoir bu, à jeun, une solution de un gramme de bicarbonate de soude, dans l'eau, j'ai avalé un quart de culture du vibron de Deneke

1. *Berl. Klin. Woch.*, 1892, et 17.

2. *Wratch*, 1893, p. 495.



sur gélose, âgée de 21 heures, et développée à 36°. L'effet pathogène a été pour ainsi dire nul.

Après avoir ainsi établi qu'un quart de culture était inoffensif pour l'homme, j'ai donné à M. D... (après qu'il eut ingéré 50 c. c. d'eau distillée renfermant un gramme de bicarbonate de soude), une demi-culture du V. D. sur gélose, âgée de 17 heures et demie et développée à 36°. La personne qui s'est soumise à l'expérience était un jeune homme de 17 ans (pesant 95 livres): malgré cela, l'effet de l'injection du vibron a été purement négatif.

On serait tenté de déduire de ces expériences l'innocuité complète du vibron de Deneke pour l'homme. Et, cependant, cette conclusion ne serait point exacte. Dans deux autres expériences, où les personnes ont ingéré une culture entière du V. D., celui-ci a produit une certaine action pathogène.

M. K... a avalé (2 heures et quart après le déjeuner) d'abord 50 c. c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0 et, aussitôt après, une culture entière du V. D. sur gélose, en suspension dans 4 c. c. de bouillon (culture de 22 heures développée à 36°). Quelques heures plus tard, M. K... a éprouvé un malaise, accompagné de fièvre. 5 heures après l'ingestion des vibrions, la température axillaire monta jusqu'à 38,1. Pendant la nuit, M. K... a été réveillé par le besoin d'aller à la garde-robe. Il s'ensuivit une selle abondante, liquide et fétide, qui n'avait été accompagnée ni de coliques ni de ténésme. Dans la journée, l'état général se rétablit. 26 heures après le début de l'expérience, il se produit une seconde selle molle, mais déjà moulée. La maladie n'a donc été que de courte durée.

Une autre personne, M. E..., a bu le matin à jeun 50 c. c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0 et, aussitôt après, une culture entière du V. D. sur gélose (âgée de 17 heures 30 minutes et développée à 36°), en suspension dans du bouillon. A la fin de la journée, M. E... a ressenti du gargouillement dans le ventre, et, le lendemain, il a eu des coliques qui ont cessé après une défécation normale. Le surlendemain, il a été réveillé par de fortes coliques, qui ont duré presque toute la journée. Il ne s'est pas cependant produit de la diarrhée, et bientôt l'état rede-vint complètement normal.

Ces expériences démontrent que, pris à forte dose, le vibron

de Deneke peut être pathogène pour l'homme. Il n'y a donc rien d'improbable dans l'hypothèse que les intoxications cholériques par le fromage puissent être dues à des vibrions, si, par hasard, il s'en développe une variété plus active que celle de Deneke. Les recherches ultérieures éclairciront peut-être cette question.

### III

#### PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DU VIBRIO PROTEUS (FINKLER ET PRIOR).

L'histoire du vibron de Finkler et Prior est très obscure. Tandis que ses auteurs affirment l'avoir trouvé dans toute une série de cas d'une épidémie bénigne, survenue à Bonn en 1885, plusieurs autres savants, notamment M. Koch, insistent sur le fait que ce vibron n'a été trouvé qu'une seule fois, dans des selles d'un malade atteint de gastro-entérite aiguë, conservées pendant longtemps en dehors de l'organisme. Retrouvé par M. Kuisl dans le cæcum d'un suicidé, le vibron de Finkler et Prior présente une analogie incontestable avec la virgule cholérique, bien qu'il ressemble moins à celle-ci que le vibron de Deneke.

Il a déjà été établi par M. Koch et ses élèves que le vibron de Finkler est pathogène pour le cobaye, si on l'introduit dans l'estomac d'après la méthode de Koch. Plus tard M. R. Pfeiffer<sup>1</sup> a prouvé qu'inoculé dans la cavité péritonéale des cobayes, le vibron de Finkler leur donne une maladie mortelle. Seulement, pour obtenir ce résultat, il fallait employer une quantité de culture plus forte que celle utilisée dans les expériences avec le vibron cholérique. M. Hueppe a donné la mort à des cobayes en leur injectant à peu près la même dose de culture dans le péritoine.

Dans mes expériences, je me suis servi de vibrions provenant de la culture originale de Finkler et Prior, et cultivés pendant plusieurs années à l'Institut Pasteur, sans qu'on ait fait de passages par l'organisme animal. Le vibron a manifesté des propriétés pathogènes pour le cobaye et le pigeon, mais sa virulence a été un peu moindre que celle du vibron de Deneke. Les cobayes, inoculés dans le péritoine avec un huitième et

<sup>1</sup> 4. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1892, t. XI, p. 408.

un quart de culture sur gélose, âgée de 20 heures (et développée à 36°), ont résisté, et ce n'est qu'à la dose d'une demi-culture que les vibrions ont été mortels pour les cobayes. Injectés dans les muscles de la cuisse, les vibrions n'ont provoqué qu'un gonflement de l'extrémité, non accompagné de troubles généraux. Les pigeons, inoculés dans le muscle pectoral avec une émulsion d'une culture entière sur gélose, meurent avec des signes de septicémie aiguë. Par contre, un lapin, auquel j'ai injecté  $\frac{3}{4}$  de culture dans la veine de l'oreille, a résisté sans présenter de troubles sérieux.

L'autopsie des cobayes et des pigeons a présenté tous les phénomènes déjà bien décrits, et qui suivent l'injection intrapéritonéale et musculaire du vibron cholérique. L'exsudat péritonéal des cobayes renferme, dans la plupart des cas, très peu de leucocytes et une grande quantité de vibrions libres et très mobiles. Il suffit de faire cette constatation pour conclure que ce sont des bactéries bien vivantes qui produisent les substances toxiques, nécessaires pour tuer le cobaye. L'hypothèse d'après laquelle cet effet serait produit par les cadavres des vibrions doit être complètement rejetée.

Je passe aux expériences sur l'homme. Cinq semaines après avoir bu sans résultat une émulsion du vibron de Deneke, j'ai avalé à jeun (après avoir pris 1 gramme de bicarbonate de soude dissous dans 40 c. c. d'eau distillée) l'émulsion dans du bouillon d'une culture entière du vibron de Finkler sur gélose. Cette culture a été faite avec le sang d'un cobaye de 605 grammes (mort en 6 heures et demie après une injection intrapéritonéale d'une culture du même vibron), et est restée pendant 14 heures à 36°. L'effet a été complètement nul.

Dans une seconde expérience, M. P... a bu d'abord 50 c. c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0, et aussitôt après une émulsion dans du bouillon de la moitié d'une culture du V. F. sur gélose, développée pendant 19 heures et 40 minutes à 36°. Le lendemain, M. P... a ressenti un peu de coliques. Le surlendemain, les coliques sont devenues plus fortes et ont été accompagnées de trois selles plus liquides que d'habitude. Bientôt après, l'état est redevenu normal.

Le vibron de Finkler, comme celui de Deneke, peut donc occasionner quelques troubles intestinaux chez l'homme. Quoi-



qu'il soit bien établi que le *choléra nostras* en général n'est point lié à la présence de ce microbe, il est possible que dans certains cas de cette maladie (qui certainement ne représente pas une unité morbide) le vibrion de Finkler joue le rôle d'agent pathogène.

#### IV

##### PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DU *VIBRIO* METCHNIKOWI. (GAMALEÏA.)

De tous les vibrions qui liquéfient la gélatine dans les conditions ordinaires, le vibrion de Gamaleïa est le plus virulent pour les animaux. Les travaux de M. Gamaleïa et d'un grand nombre d'autres observateurs ont suffisamment démontré que ce microbe est très pathogène pour le cobaye, qu'il tue même en injection sous-cutanée, et pour le pigeon. Les poulets et les lapins sont moins sensibles, mais peuvent également mourir à la suite de son introduction dans l'organisme.

Je peux donc me borner à relater mes expériences sur l'homme. Comme je n'avais éprouvé aucun effet après avoir avalé les vibrions de Deneke et de Finkler, j'ai renoncé à ingérer le vibrion de Gamaleïa, me considérant comme trop indemne vis-à-vis de ces microbes.

Mais deux autres personnes se sont soumises à l'expérience. M. Gr... a bu dans des conditions favorables (deux heures après un petit déjeuner et aussitôt après l'ingestion de 50 c. c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0), la suspension dans 4 c. c. de bouillon stérile d'un tiers d'une culture du vibrion de Gam. sur gélose, développée pendant 23 heures à 36°. Un autre tiers de la même culture a été injecté dans le muscle pectoral d'un pigeon de 322 gr., et le tiers restant a été introduit sous la peau d'un cobaye de 380 gr. Ce dernier mourut au bout de 5 heures avec les signes d'une infection des plus aiguës. Il ne s'est pas formé chez lui d'œdème cutané, mais bien un exsudat séreux dans la plèvre et le péritoine. Cet exsudat ne renfermait presque pas de leucocytes, mais contenait une masse de vibrions mobiles. Le pigeon mourut 8 à 9 heures après l'inoculation, présentant le tableau d'une septicémie généralisée.

Malgré la virulence du vibrion pour les animaux mention-

nés, M. Gr. n'a ressenti aucun malaise. Sa santé a continué à être parfaite.

Dans une seconde expérience, l'effet a été aussi nul, quoique M. C... ait avalé (avec les mêmes précautions que dans toutes mes expériences sur l'homme) deux tiers d'une culture de V. M. sur gélose, développée pendant 19 heures et 45 minutes à 36°. La culture était de même origine que celle qui a servi à M. Gr.

Ces résultats ne sont pas en contradiction avec l'assertion de M. Gamaleïa, à savoir que le vibron qu'il a découvert peut engendrer le choléra nostras chez l'homme<sup>1</sup>. D'ailleurs, cette affirmation n'a pas été accompagnée de preuves suffisantes.

## V

### PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DU VIBRIO CHOLERÆ (KOCH).

Comme je l'ai déjà dit au commencement de cet article et comme cela a été constaté par un grand nombre de chercheurs, la virulence du vibron cholérique est très variable. On cite souvent, comme mesure de cette propriété, la donnée fournie par M. R. Pfeiffer, d'après laquelle un vingtième d'une culture fraîche sur gélose, pesant 1, 5 mg., suffirait pour tuer par voie intrapéritonéale un cobaye de 300-350 gr. Mais ce résultat se rapporte au vibron de Massaua, recueilli par M. Pasquale et connu par sa virulence exceptionnelle. Ce vibron est très pathogène; même inoculé sous la peau il tue les cobayes; il fait aussi périr les lapins et les pigeons. Dans mes expériences<sup>1</sup>, 1/12 d'une culture sur gélose (âgée de 20 heures et cultivée à 36°), introduit dans le péritoine de cobayes de 300 à 400 gr., les tuait en 12 et 15 heures. Un sixième de la même culture suffisait pour donner la mort à des cobayes par inoculation hypodermique. Des cultures du vibron de Massaua dans du bouillon peptonisé étaient aussi mortelles pour les cobayes, à la dose de 1 c. c. dans le péritoine, ou de 2 c. c. sous la peau. Des cultures préparées dans l'eau peptonisée, renfermant 2 à 5 0/0 de gélatine, étaient plus virulentes encore: des fractions de centimètre cube injectées dans le derme suffisaient pour

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888.

2. Le vibron de Massaua, dont je me suis servi, m'a été obligeamment envoyé par M. Sanarelli et provient de la culture originale de M. Pasquale.

tuer les cobayes adultes. Même des cultures anciennes du vibron de Massaua, faites dans du bouillon de thymus préparé d'après les indications de Wooldridge et de MM. Brieger, Kitasato et Wassermann, conservaient leur grande virulence.

Mais la virulence du vibron de Massaua ne peut pas servir de type pour toutes les variétés du vibron cholérique. Il est vrai que dans ces derniers temps on a trouvé aussi en Europe des bacilles virgules doués d'une très forte propriété pathogène. Ainsi M. Wyssokowitch<sup>1</sup> a isolé à Charkoff un vibron cholérique dont 0,5 à 1 c. c. d'une culture en bouillon, âgée de 24 heures, suffisait pour tuer des lapins par voie sous-cutanée. Cette virulence exceptionnelle ne s'est pas conservée longtemps : trois mois plus tard, il fallait des quantités 5 à 10 fois plus grandes pour obtenir le même résultat. M. Sawtchenko<sup>2</sup> a pu constater que les vibrions cholériques, isolés du contenu intestinal lors de l'épidémie de Kieff, en 1892, avaient des virulences très différentes. A côté de variétés mortelles pour les pigeons, il en a trouvé d'autres, inoffensives pour cette espèce. Tout récemment M. Vincenzi<sup>3</sup> a étudié un vibron, isolé par M. Weichselbaum d'un cas de choléra à Vienne, et remarquable par sa grande virulence pour le pigeon et le cobaye.

On peut donc tirer cette conclusion générale que même les vibrions cholériques récemment isolés du contenu intestinal se distinguent par une grande variabilité de leur virulence. Cette fonction ne peut donc être considérée comme une qualité stable et constante.

Les cultures du bacille virgule, entretenues pendant un certain temps dans les laboratoires, fournissent une nouvelle preuve de cette instabilité. Certaines d'entre elles, comme, par exemple, le vibron de Massaua, conservent leur grande virulence même après une période très longue de culture en dehors de l'organisme. On peut encore augmenter l'activité de ce microbe. Dans les cultures faites à 35-38° dans une eau peptonisée à 5-10 0/0 et contenant en outre de 2 à 5 0/0 de gélatine, ce vibron devient très toxique et virulent. Des passages à travers des cobayes vaccinés ont encore augmenté ces propriétés. M. Klemperer<sup>4</sup> a renforcé

1. *Wratch*, 1893, p. 461.

2. *Ibid.*, p. 26.

3. *Archivio per le scienze mediche*, 1893, t. XVII, p. 137.

4. *Verhandlungen des XII Congresses f. innere Medicin*, 1893, p. 65.

le microbe de Massaua à tel point qu'une goutte de culture en bouillon, âgée de 24 heures, injectée dans le péritoine, tue sûrement un cobaye de 300 grammes.

D'un autre côté, il existe des variétés de vibrions cholériques incontestables qui se distinguent par leur faible virulence pour les espèces animales. Tel est le vibron du choléra de Paris, 1884. Je possède des cultures de ce microbe, grâce à l'obligeance de M. Chantemesse, qui l'a isolé et entretenu depuis lors dans son laboratoire.

Une culture entière de ce vibron sur gélose, développée pendant 20 heures à 36°, injectée dans la cavité péritonéale d'un cobaye de 415 grammes, ne lui a même pas donné d'hyperthermie ni d'hypothermie passagère (temp. 5 heures après l'inoculation, 38,4; 2 heures plus tard, 39,0; 10 heures après le début de l'expérience, 39,2). Le cobaye a supporté cette dose énorme de vibrions sans le moindre trouble dans sa santé. Parmi trois autres cobayes qui reçurent dans le péritoine 1/2, 1/4 et 1/8 des mêmes cultures, celui qui a reçu 1/4 de culture (poids 467 grammes) a succombé 25 heures après l'inoculation, avec très peu de vibrions dans l'exsudat et des signes d'une forte réaction leucocytaire. Deux autres cobayes (de 497 et 465 grammes) ont survécu et n'ont pas présenté de troubles. Les lapins sont aussi insensibles à l'injection intraveineuse de grandes quantités de cultures sur gélose du vibron de Paris, 1884.

Les cultures des vibrions cholériques que j'ai étudiés au point de vue de la virulence peuvent être rangées entre les deux extrêmes cités : le vibron de Massaua et celui de Paris, 1884. Je ne mentionnerai ici que le résultat des expériences avec trois sortes de cultures : 1° le vibron de Hambourg, isolé pendant l'épidémie de 1892; 2° celui de Courbevoie, isolé par M. Netter chez M<sup>lle</sup> L..., qui a eu une attaque de choléra grave, terminée par la guérison, au mois de juillet 1892. Je dois ces deux vibrions à l'obligeance de M. le professeur Netter; 3° choléra du laboratoire de l'Institut Pasteur, qui m'avait été fournie en octobre 1892 par M. Haffkine.

Les cultures du vibron de Hambourg sur gélose, développées pendant 16 heures à 36°, tuent des cobayes de 320 à 415 grammes à partir d'une demi-culture. Le vibron de Courbevoie est plus virulent : un quart de culture sur gélose (déve-



loppée pendant 17<sup>h</sup> à 36°) suffit pour tuer un cobaye de 570 grammes. Ce vibron est aussi mortel pour le pigeon (3/4 de la même culture dans le muscle pectoral) et le lapin (1/2 culture dans la veine de l'oreille). Le V. du choléra de M. Haffkine présente une virulence un peu moindre; 1/3 de culture (préparée dans les mêmes conditions) tue sûrement un cobaye adulte; 1/4 ne le fait pas périr dans tous les cas. Injecté à la dose de 3/4 de culture fraîche dans le muscle pectoral du pigeon, il ne lui a donné qu'un malaise passager.

J'insiste sur ces particularités de la virulence, non seulement pour fournir des documents en faveur de la variabilité de cette propriété, mais surtout pour servir de guide dans l'appréciation des expériences faites sur l'homme avec ces trois variétés de vibrions.

Deux jours après avoir avalé sans effet le vibron de Finkler et Prior, lorsque je pouvais être encore sous l'influence de ce microbe, j'ai absorbé (aussitôt après avoir bu 1 gramme de bicarbonate de soude dans 40 c. c. d'eau distillée) une émulsion dans du bouillon stérile d'une demi-culture du vibron de Hambourg. Ce microbe avait été cultivé sur gélose pendant 2 jours à 36°, et conservé pendant 16 jours à 18-20°. La culture renfermait, à côté de vibrions et de spirilles, beaucoup de corps ronds, et, réensemencée sur la gélose, elle donna une culture abondante déjà au bout de peu d'heures. L'ingestion des vibrions a été faite 2 heures après le déjeuner du matin.

L'autre moitié de la même culture a été avalée exactement dans les mêmes conditions par mon aide de laboratoire M. Latapie. Ni ce dernier, bien qu'il soit très sujet à des indigestions, ni moi ne nous sommes nullement ressentis de la présence d'une quantité immense de vibrions cholériques vivants dans notre corps. Les selles étaient normales pendant toute la semaine qui suivit l'injection, et l'examen le plus minutieux ne me permit pas d'y découvrir des bacilles virgules.

Huit jours après cette première expérience avec le vibron de Hambourg, nous nous sommes soumis à une seconde. M. Latapie et moi nous avons ingéré, 2 heures après le déjeuner du matin et aussitôt après avoir bu 1 gramme de bicarbonate de soude dissous dans 40 c. c. d'eau distillée, une demi-culture du vibron de Hambourg, développée sur gélose

pendant 24 heures à 35°, et conservée dans une armoire obscure à 18-20° pendant 6 jours. La culture, mélangée avec du bouillon stérile, a donné une suspension très trouble. Cette fois-ci, comme dans toutes mes autres expériences, nous ne nous étions soumis à aucun régime particulier. Je mangeai beaucoup de végétaux crus (radis, salade, concombres, fraises) comme d'habitude. Mais malgré ce manque de précautions, aucun de nous ne fut malade à la suite de l'infection par les vibrions. Ce n'est qu'à la fin de la sixième journée que M. L... et moi ressentîmes du gargouillement dans le ventre et un certain malaise. Le lendemain matin, cet état s'est accentué chez moi, et il s'établit un peu de dérangement intestinal. Ce même jour, 2 h. 20 minutes après le premier déjeuner, j'absorbais 50 c. c. d'une solution aqueuse de bicarbonate de soude à 2 0/0, et aussitôt après la suspension dans 4 c. c. de bouillon stérile d'un tiers de culture du vibron de Hambourg sur gélose. Cette culture avait été semée 17 heures avant, et maintenue pendant tout ce temps à 36°. Sur les préparations microscopiques, on pouvait constater des masses de vibrions caractéristiques et très peu de corps sphériques.

Le second tiers de la même culture a été avalé par M. Latapie, et le troisième par M. Gr., qui, auparavant, n'avait absorbé qu'un tiers d'une culture du vibron de Gamaleïa. L'ingestion a été faite avec les mêmes précautions que celles que j'avais prises (deux heures après le déjeuner et aussitôt après l'ingestion de 50 c. c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0). Dans cette expérience, deux entre nous avaient déjà subi l'effet de deux ingestions de cultures de Hambourg, tandis que M. Gr. se soumettait à l'influence du vibron cholérique pour la première fois.

Quelques heures après l'ingestion des vibrions, ma santé redevint brusquement tout à fait normale. Les jours suivants elle était également très bonne. Chez moi, ainsi que chez M. L..., il s'établit une tendance vers la constipation. Neuf jours après l'ingestion de la culture chez mon aide, il se manifesta une diarrhée de peu d'intensité qui dura pendant quelques jours. L'examen bactériologique de ses déjections montra la présence du *bacillus coli* et de quelques bactéries liquéfiant la gélatine, mais il ne se développa pas une seule colonie du bacille virgule. Cette diarrhée n'avait donc rien à faire avec les vibrions ingérés

et ne présentait que le retour d'une de ces indigestions fréquentes qui avaient été suspendues pendant tout le cours des expériences avec le choléra de Hambourg.

Il m'a été également impossible de découvrir le bacille virgule dans mes déjections.

Tandis que chez M. L... et moi qui avions absorbé le vibrion de Hambourg pour la troisième fois, il ne se manifesta aucune maladie, chez M. Gr. il s'établit une diarrhée due sûrement à l'influence des vibrions. Malgré que cette personne fût, en général, d'une santé parfaite et pas du tout sujette à des indigestions, il se déclara, 16 heures après l'ingestion des vibrions, une diarrhée liquide. M. Gr. a été réveillé à 4 heures du matin par le besoin d'aller à la selle, sans éprouver ni de coliques ni d'autres troubles quelconques. Pendant le matin et la journée, il se produisit quatre selles liquides, mais colorées, qui, quoique renfermant plusieurs espèces bactériennes, ne donnèrent sur des plaques de gélatine qu'une culture pure de bacilles virgules. Le jour suivant, il ne se produisit qu'une selle liquide, renfermant beaucoup de vibrions cholériques. Le quatrième jour après le début de l'expérience, il survint la première selle dure, dans laquelle on pouvait cependant retrouver des bacilles virgules. Sur des plaques de gélatine, faites avec ces déjections, il se développa beaucoup de colonies du *bacillus coli* et très peu de colonies vibrioniennes. Mais le lendemain les selles prirent de nouveau une consistance plus liquide et donnèrent sur plaque une quantité beaucoup plus grande de colonies du bacille virgule. A partir du sixième jour après l'ingestion des vibrions, l'état de M. Gr. redevint absolument normal. Pendant qu'il avait cette légère diarrhée, M. Gr. ne ressentit aucun trouble gastrique ni la moindre altération générale de sa santé.

Quoiqu'il soit difficile de tirer des conclusions certaines d'un si petit nombre de faits, il paraît cependant résulter de cette expérience sur le vibrion de Hambourg que l'ingestion préalable de cultures âgées de plusieurs jours n'occasionne non seulement aucun trouble intestinal (ou autre), mais vaccine contre l'action diarrhéique de cultures jeunes du même microbe. D'un autre côté, il semble résulter que l'ingestion préalable du vibrion de Gama-leïa ne protège pas contre cette action du vibrion de Hambourg.

Le fait de la vaccination par des cultures vivantes ingérées

concorde parfaitement avec l'observation de M. Hasterlik <sup>1</sup>. Des cultures du bacille virgule dans la gélatine, ingérées sans alcalinisation préalable de l'estomac, furent sans action sur M. Hasterlik. Plus tard, il n'éprouva non plus aucun effet à la suite de l'ingestion du même microbe, même après avoir préparé l'estomac en avalant 1 gramme de bicarbonate de soude. Un collaborateur de M. Hasterlik, qui but d'emblée la même culture après alcalinisation de l'estomac, eut une diarrhée moyenne. M. Gaffky <sup>2</sup> considère cette expérience comme la preuve que M. Hasterlik avait été vacciné par les cultures ingérées précédemment.

Des tentatives de vaccination de l'homme par ingestion de cultures stérilisées du bacille virgule ont été entreprises d'abord par M. G. Klemperer <sup>3</sup>, et tout récemment par MM. Sawtchenko et Zabolotny <sup>4</sup>. Le premier de ces observateurs ingéra à plusieurs reprises une grande quantité (503 c. c.) de cultures de vibrion, stérilisées pendant deux heures à 70°. L'ingestion ne produisit aucun trouble apparent, et eut comme suite l'augmentation du pouvoir préventif du sang. Mais M. Klemperer pense que le temps très long qui a été nécessaire pour obtenir ce résultat présente un inconvénient trop grand pour que la méthode puisse être employée dans la pratique.

MM. Sawtchenko et Zabolotny ont répété cette expérience avec quelques modifications. Ils ont ingéré des cultures de vibrion, stérilisées à 60°-70°, et additionnées d'un 1/20/0 d'acide phénique. Dans un espace de plus d'un mois ils avalèrent 2,348 gr. (Zabolotny) et 1,758 gr. (Sawtchenko) de résidu sec de ces cultures. Bientôt après, ces deux observateurs firent une expérience d'épreuve. Après avoir bu 100 c. c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0, ils avalèrent 0,1 c. c. d'une culture du vibrion cholérique en bouillon, développée à 37° pendant 24 heures; 0,5 c. c. de la même culture suffisait pour tuer un lapin par injection intrapéritonéale. Les vibrions ingérés ne produisirent aucun effet nuisible. La fonction digestive continua à être normale, quoique les déjections renfermassent un nombre notable de bacilles virgules.

1. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1893, p. 167.

2. *Verhandl. des XII Congr. f. inn. Medicin.*, 1893, p. 49.

3. *Berl. Klin. Woch.*, 1892, et 50.

4. *Wratch*, 1893, p. 572.



Le traitement préventif a duré trop longtemps pour pouvoir être pratique. En ce qui concerne le résultat fondamental, c'est-à-dire l'efficacité de la vaccination, il est très difficile de se faire un jugement, parce qu'on ne sait pas comment agirait la même dose de culture (0,1 c. c.) avalée sans traitement préalable. MM. Sawtchenko et Zabolotny citent comme témoin M. Emmerich, qui a eu une diarrhée cholériforme à la suite de l'ingestion de la même dose de culture en bouillon. Mais M. Emmerich a commis certains écarts de régime, ce que n'ont pas fait les deux savants russes.

Comme nous l'avons déjà dit dans notre premier mémoire, les inoculations sous-cutanées de cultures cholériques n'ont pas empêché M. Ferran lui-même, ni d'autres personnes mentionnées par lui, d'avoir une diarrhée passagère après qu'il seurent bu des cultures du bacille virgule. M. Pauli<sup>1</sup>, bien qu'il ait été vacciné 13 fois (par voie hypodermique), a eu la diarrhée après avoir bu quelques gouttes de cultures de vibrions, et même sans saturation préalable de l'acide gastrique. Il paraît donc que cette méthode n'est point efficace.

Dans le courant de nos recherches sur l'homme, deux personnes ont ingéré un tiers de culture du vibron de Courbevoie (dont la virulence pour les animaux a été spécifiée plus haut) sur gélose, développée pendant 19 heures 40 minutes à 36°. Une de ces personnes, M. G..., avait subi six mois et demi auparavant les deux inoculations préventives de M. Haffkine. La température monta après la première injection sous-cutanée à 38°,6. La seconde inoculation fut suivie d'une hyperthermie et de troubles généraux moins forts que la première. La personne en question, jeune homme de 21 ans, robuste (poids 130 livres), n'est sujette à aucun trouble des organes digestifs. Elle but, à jeun, 50 c.c. d'une solution de bicarbonate de soude à 2 0/0 dans de l'eau distillée, et aussitôt après un tiers d'une culture sur gélose en suspension dans du bouillon. Le lendemain se déclara une diarrhée liquide, accompagnée de quelques coliques, mais sans troubles généraux d'aucune sorte. Le jour suivant, la diarrhée insignifiante continua encore. Mais le lendemain elle fit place à la constipation. Le cinquième jour après l'ingestion de la culture,

1. *L'inoculation préventive contre le choléra*. Paris, 1893.

la diarrhée reprit un peu plus forte (trois selles dans la journée) elle était accompagnée d'un malaise général. Le sixième jour M. G... éprouva une faiblesse générale, avec absence d'appétit; la langue était chargée, et il se produisit une déjection très liquide et abondante, mais colorée. On administra 0,5 de calomel, en doses fractionnées; après quoi, il y eut encore deux selles liquides. Le lendemain matin il se produisit encore une évacuation liquide, mais l'état général s'améliora rapidement et M. G... guérit d'une façon définitive. L'examen bactériologique des déjections a démontré la présence de vibrions cholériques pendant cinq jours. Les deux premières journées, les selles diarrhéiques ne donnaient sur les plaques de gélatine que des cultures presque pures du bacille virgule. Le *bacillus coli* était très rare. Le cinquième jour (après le début de l'expérience), il ne se développait que peu de colonies vibrioniennes. Par contre, les plaques contenaient un grand nombre de cultures du *B. coli*, ainsi que d'une espèce de coccobacille liquéfiant fortement la gélatine. Le jour suivant (recrudescence de la maladie), les vibrions cholériques prirent de nouveau le dessus sur les autres microbes; les coccobacilles disparurent complètement des plaques.

Une autre personne, M. S..., a bu un tiers de la même culture du vibron de Courbevoie, et exactement dans les mêmes conditions que M. G... Six mois et demi auparavant, elle aussi avait été inoculée par M. Haffkine. Mais l'effet de la première injection vaccinale (culture atténuée de M. Haffkine) avait été tellement douloureux et l'état général si troublé (la température monta au delà de 39°) que M. S... renonça à la seconde inoculation.

Les quatre premières journées de l'expérience, M. S... se sentit très bien, malgré une constipation, des gargouillements et des douleurs dans le ventre. Mais le cinquième jour il éprouva un malaise général et dut prendre un lavement à la glycérine. Une évacuation abondante n'amena pas la guérison. Dans la matinée et dans la journée suivante, il se déclara une diarrhée liquide et abondante et l'état général s'améliora. Le lendemain il se produisit encore une évacuation liquide, après quoi la santé se rétablit parfaitement. Les selles normales, évacuées le lendemain de l'ingestion des vibrions, ne donnèrent sur plaques de gélatine que des colonies non liquéfiantes. Par contre, les déjec-

tions diarrhéiques produisirent des colonies du bacille virgule, entremêlées avec celles du *b. coli*.

Les vaccinations sous-cutanées de M. Haffkine, pratiquées six mois et demi avant l'expérience, n'empêchèrent donc ni l'action diarrhéique du vibron cholérique, ni la provocation d'un état de malaise général.

Une troisième personne, M. B..., qui n'avait jamais été soumise ni à des vaccinations anticholériques, ni à un traitement préventif quelconque, a ingéré un tiers d'une culture sur gélose du même vibron de Courbevoie. Deux heures et quart après son déjeuner, et aussitôt après avoir bu 50 c. c. d'une solution aqueuse de bicarbonate de soude, M. B... ingéra 4 c.c. de bouillon stérile, dans lequel était dilué un tiers d'une culture du vibron de Courbevoie sur gélose, développée pendant 22 heures à 36°. A peu près 17 heures après l'ingestion des vibrions, M. B... a été réveillé par le besoin d'aller à la selle. Il s'ensuivit une déjection liquide, colorée. Dans la même journée, il y eut encore trois selles présentant les mêmes caractères. L'appétit et la santé générale étaient parfaits. Le lendemain, il se produisit quatre selles liquides et colorées, accompagnées de gargouillement. L'état général était tout à fait satisfaisant. Le surlendemain, la diarrhée diminua et la santé resta très bonne. Le cinquième jour de l'expérience, la diarrhée cessa presque complètement, mais, dans la soirée, M. B... commit un imprudent écart de régime : il but plusieurs verres de bière ; après quoi, la diarrhée réapparut. Dans la nuit et le lendemain, M. B... a eu en tout cinq déjections liquides, colorées. L'état général resta inaltéré. Le jour suivant, il se produisit encore deux selles presque normales et, le lendemain, M. B... était complètement rétabli. A l'examen bactériologique, les selles liquides donnèrent sur plaques de gélatine des cultures presque pures du vibron cholérique.

Dans ce cas, malgré l'absence de traitement préventif quelconque, et malgré même un écart de régime, l'effet d'une quantité très considérable de vibrions ne se traduisit que par une diarrhée moyenne, non accompagnée de troubles généraux. Si les deux personnes inoculées par les vaccins de M. Haffkine ont eu moins de diarrhée, elles ont éprouvé un malaise général prononcé qui a fait défaut chez M. B... Parmi les deux personnes

qui subirent les vaccinations de M. Haffkine, celle qui avait été inoculée deux fois a été plus éprouvée par les vibrions que M. S..., qui ne fut vacciné qu'une seule fois.

Comme dans les expériences anciennes de M. Ferran, on ne peut nullement considérer comme prouvé que les inoculations hypodermiques des vibrions empêchent l'action de ces microbes lorsqu'ils sont introduits dans le canal digestif.

Parmi les expériences sur l'homme, je dois encore en citer une qui a été faite dans des conditions particulières. M. Gatchkowsky, inventeur d'un remède désigné par lui sous le nom de « vitaline » (composé d'une solution de borax dans de la glycérine), se présenta souvent chez moi avec le désir d'être inoculé avec des microbes des plus virulents. Subissant journellement les injections de son remède, il se considérait comme indemne vis-à-vis de beaucoup d'agents morbides. Je consentis à administrer à M. Gatchkowsky une dose de bacilles virgules. Je fis préalablement l'expérience de l'action du remède boroglycérique sur les animaux. Deux cobayes reçurent dans le péritoine une dose mortelle du vibron du laboratoire (dont la virulence a été décrite plus haut) et immédiatement après on leur injecta sous la peau 1 c. c. du remède. Deux et cinq heures plus tard, ils reçurent encore 1 c. c. de la même solution. Cela ne les empêcha point de mourir après 12 à 15 heures, avec une masse de bacilles virgules dans l'exsudat péritonéal.

Dans l'après-midi, deux heures et quart après son déjeuner, M. Gatchkowsky absorba d'abord 50 c. c. de bicarbonate de soude à 2 0/0 et, immédiatement après, une suspension en bouillon d'une demi-culture du vibron du laboratoire de l'Institut Pasteur, développée pendant 24 heures à 35°, et conservée pendant deux jours à 18°. L'ensemencement avait été fait avec le sang d'un cobaye mort d'une infection cholérique péritonéale très aiguë. La seconde moitié de la même culture a été injectée dans le péritoine d'un cobaye neuf de 490 gr., qui ne tarda pas à succomber.

La dose immense de vibrions ingérés ne provoqua chez M. Gatchkowsky aucun symptôme cholériforme. Il s'établit, au contraire, une constipation passagère. Le lendemain de l'ingestion des microbes, M. Gatchkowsky a ressenti des douleurs dans le ventre et des nausées, ce qui lui a fait prendre jusqu'à 300



gouttes de son remède. Le jour suivant, malgré la constipation, sa santé était tout à fait normale. Dans les selles dures du second et du quatrième jour de l'expérience, il a été impossible de retrouver le bacille virgule, malgré toutes les tentatives faites.

D'après cette expérience, ainsi que d'après celles relatées plus haut, on pourrait supposer que les cultures du bacille virgule, provenant de l'épidémie de 1892 (Hambourg et Courbevoie), ou d'une variété de laboratoire, quoique virulentes pour les animaux, avaient perdu, en grande partie, leur action sur l'homme, et cela malgré l'emploi de fortes quantités de cultures sur gélose. Le cas suivant prouve qu'en réalité il n'en est point ainsi. Un jeune homme de dix-neuf ans, M. J..., avait absorbé à jeun, après avoir bu 50 c. c. de bicarbonate de soude à 2 0/0, une émulsion d'un tiers d'une culture sur gélose du choléra de Paris de 1884, développée pendant 20 heures à 36°. Il a déjà été dit plus haut que cette variété était, même à forte dose, inoffensive pour les animaux. M. J... n'est point sujet aux indigestions; il est, en général, bien portant et rien ne permettait de supposer chez lui une prédisposition spéciale. Cependant, les vibrions -ingérés provoquèrent chez lui un vrai choléra asiatique qui, quoique léger, présenta tous les symptômes classiques de cette maladie. L'incubation a été de courte durée. Neuf heures après l'ingestion des vibrions, M. J... ressentit des coliques faibles et, trois heures plus tard, survint la première déjection liquide et copieuse. Il s'établit bientôt une diarrhée fréquente qui dura pendant deux jours. Les selles, d'abord colorées, ont fini par prendre un aspect riziforme tout à fait typique. Il y eut une hypothermie modérée, des vomissements répétés, et même quelques crampes des mollets. Le second jour de la maladie, l'anurie était presque complète. Le diagnostic n'était donc pas douteux. Le troisième jour de la maladie, la réaction survint, qui amena une amélioration et la guérison définitive. Cependant les selles, redevenues colorées, ont été liquides pendant plusieurs jours.

Les selles des deux premiers jours de la maladie, celles qui étaient colorées ainsi que celles qui étaient riziformes, semencées sur gélatine, donnèrent presque des cultures pures de vibrions cholériques; il ne poussait que quelques rares colonies du *bacillus coli*. A partir du cinquième jour, les selles donnèrent beaucoup de colonies du *b. coli*; les vibrions ne poussaient que

tardivement et en nombre toujours décroissant. Les premières selles normales (12<sup>e</sup> jour),ensemencées sur des plaques de gélatine et dans de l'eau peptonisée (1 0/0 peptone, 1 0/0 sel marin) avec réensemencement sur de nouvelles plaques, ne donnèrent plus une seule colonie de bacilles virgules. Mais, ensemencées dans le liquide que j'emploie dans les recherches du choléra et, surtout pour le diagnostic (1 0/0 peptone Chapoteaut, 1 0/0 sel marin, 2 0/0 gélatine), elles donnèrent des cultures de bacille virgule, et celles-ci, réensemencées ensuite sur des plaques de gélatine, ont donné de nombreuses colonies de vibrions cholériques. Cette méthode, la plus sensible que je connaisse, a révélé la présence de ces microbes jusqu'au 17<sup>e</sup> jour après le début de la maladie, lorsque M. J... était depuis longtemps complètement rétabli et que ses selles étaient redevenues absolument normales.

L'idée que dans ce cas le choléra avait été produit par une cause autre que les vibrions ingérés doit être complètement exclue. Depuis le mois de décembre 1892 (époque à laquelle il se produisit quelques cas de choléra très rares), Paris est tout à fait indemne de cette maladie. Les cas suspects, signalés dans ces derniers mois, étaient tout à fait sporadiques, et dus à d'autres causes que le vrai choléra. J'ai eu l'avantage d'examiner la plupart de ces cas suspects, grâce à l'obligeance de M. le D<sup>r</sup> Lion, et dans aucun je n'ai pu constater le bacille virgule, malgré les méthodes perfectionnées de diagnostic. D'un autre côté, il faut tenir compte de ce que M. J... habite l'Institut Pasteur, où, même lors de l'épidémie cholérique de 1892, il ne survint pas un seul cas tant soit peu suspect. L'Institut Pasteur est irréprochable au point de vue hygiénique, de sorte qu'il est impossible d'invoquer quelque facteur prédisposant d'ordre local.

Il est à peine nécessaire d'ajouter que, dans toutes les expériences ci-dessus, les déjections des personnes traitées ont été soigneusement désinfectées, et qu'il ne se produisit ni à l'Institut Pasteur, ni dans ses environs aucun cas suspect.

## VI

INFLUENCE DU PASSAGE PAR L'ORGANISME HUMAIN SUR LA VIRULENCE  
DU VIBRION CHOLÉRIQUE.

Comme dans toutes mes expériences sur l'homme la virulence des vibrions employés était bien connue, j'ai pu facilement étudier les changements survenus dans l'activité pathogène après le passage par l'organisme humain.

Il faut distinguer deux catégories de cas. D'abord la série des expériences où l'ingestion des vibrions cholériques ne provoqua qu'une diarrhée légère ou moyenne, et ensuite le cas où ces microbes ont donné le vrai choléra.

Les vibrions de Courbevoie, retirés des selles liquides de M. B..., ainsi que les bacilles virgules de Hambourg, passés par l'organisme de M. Gr., ont manifesté une virulence notablement moins forte que les mêmes microbes avant leur passage par l'organisme humain. Ainsi, par exemple, le vibrion de Courbevoie des déjections de M. B. n'a pas tué le pigeon, tandis que la culture originelle, injectée dans les mêmes conditions, était mortelle pour cette espèce. Le lapin, inoculé dans la veine par une demi-culture du vibrion de M. B... ne mourut que beaucoup plus tard que son témoin, inoculé par la même quantité de la culture originelle, etc.

Cette tendance vers l'atténuation était moins prononcée dans le cas de deux personnes, vaccinées par voie sous-cutanée, qui avalèrent plus tard des vibrions de Courbevoie. Par contre, les vibrions du choléra de Paris de 1884, isolés des déjections cholériques de M. J..., présentèrent un notable renforcement de la virulence. Les cobayes, inoculés dans le péritoine, avec une culture entière et une demi-culture sur gélose du vibrion, isolé des déjections du second jour de la maladie, moururent avec les symptômes typiques, et cela malgré leur poids considérable de 522 et 623 grammes. Le cobaye de 349 grammes, qui ne reçut qu'un quart de la même culture, a survécu après une maladie passagère et pas trop forte. Dans une autre expérience, faite avec une culture du vibrion des déjections du cinquième jour de la maladie, l'injection intrapéritonéale a été mortelle non seule-

ment pour un cobaye qui a reçu une demi-culture, mais même pour celui (pesant 485 grammes) qui n'en a reçu qu'un quart.

Mais ce renforcement n'a pas été de longue durée. Les vibrions cholériques, isolés des déjections normales recueillies le 17<sup>e</sup> jour après l'injection de la culture par M. J..., ont été incapables de tuer un cobaye de 490 grammes qui reçut dans la cavité abdominale un quart de culture sur gélose (développée pendant 20 heures à 36°). Même un cobaye de 462 grammes qui fut inoculé de la même façon avec une demi-culture ne présenta qu'un malaise passager.

Le vibron de Paris 1884, renforcé pendant les premiers jours de la maladie, est retombé à sa virulence primitive après la guérison de M. J... Cet exemple nous montre combien il serait imprudent de nier la nature cholérigène du vibron en s'appuyant sur son innocuité pour les animaux du laboratoire.

#### RÉSUMÉ

Malgré sa parenté étroite avec plusieurs espèces vibriennes, surtout avec le vibron de Gamaleïa, le bacille virgule de Koch, dont le diagnostic présente souvent de très grandes difficultés, est bien le microbe spécifique du choléra. Quoiqu'il existe des points obscurs dans l'étiologie et la marche des épidémies cholériques (surtout l'immunité locale), ce n'est plus la théorie de Koch qui doit s'adapter aux faits de l'épidémiologie, mais bien ces faits qui doivent être conciliés avec cette vérité fondamentale, que le bacille virgule est l'agent spécifique du choléra asiatique.

D'un autre côté, il résulte des expériences rapportées que les vibrions cholériques peuvent être ingérés en très grande quantité sans provoquer le choléra. Pour que cette maladie se produise, il faut une sensibilité particulière de l'organisme humain, dont les éléments nous sont inconnus. Il ne s'agit pas ici d'une prédisposition à l'indigestion, mais bien de quelque chose de particulier. Les conditions dans lesquelles se trouvent les vibrions cholériques chez l'homme sont très compliquées. Ces microbes, ainsi que leurs produits, entrent en relations multiples avec les sucs digestifs et les cellules de l'organisme (les phagocytes jouent un rôle incontestable dans le choléra humain, comme j'ai pu



m'en assurer par l'observation directe). D'un autre côté, les vibrions et les toxines entrent en collision avec les autres microbes du canal digestif et subissent l'influence de leurs produits divers. Tous ces points délicats ne pourront être éclaircis que par des recherches ultérieures.

A en juger d'après le petit nombre d'expériences qui ont été exécutées, la vaccination de l'homme par voie digestive est beaucoup plus efficace que celle faite par voie hypodermique.

Les vibrions analogues au bacille virgule peuvent être aussi pathogènes pour l'homme.

Grâce aux résultats obtenus, les faits réunis dans mon premier mémoire sur le choléra peuvent être interprétés d'une façon plus précise. On peut considérer comme acquis que la guérison naturelle dans le choléra s'accomplit sans que la propriété préventive du sang s'établisse. D'un autre côté, cette propriété peut se développer sans que cela empêche l'homme atteint de choléra de mourir de cette maladie, même dans la première période de son évolution.

Le choléra humain nous fournit donc un nouvel exemple d'une maladie où la guérison ne peut être expliquée par la propriété préventive du sang.

---

## REVUES ET ANALYSES

---

PURDIE et WALKER. Résolution de l'acide lactique en ses composants optiquement actifs. *Journal of chem. Soc.*, 1892.

L'acide lactique se rencontre si fréquemment parmi les produits de l'action des microbes sur les sucres et les substances hydrocarbonées, qu'on ne sait plus trop, à vrai dire, ce que c'est qu'un ferment lactique, s'il faut appeler de ce nom tous ceux qui donnent naissance à cet acide. L'étude de ces divers ferments lactiques est à l'ordre du jour, et nous avons inséré à plusieurs reprises, dans ces *Annales*, des documents curieux sur cette question. A ces documents est venu s'en ajouter tout dernièrement un nouveau de la plus grande importance, c'est la démonstration que l'acide lactique ordinaire inactif peut être dédoublé, à la façon de l'acide racémique, par des moyens purement chimiques, en deux acides lactiques doués de pouvoirs rotatoires de sens contraires. Chose tout aussi intéressante, MM. Purdie et Walker sont arrivés à ce résultat en appliquant les méthodes inaugurées par M. Pasteur pour le dédoublement de l'acide racémique, c'est-à-dire en utilisant les différences de solubilité des sels formés par les deux acides droit et gauche avec un même alcaloïde actif sur la lumière polarisée. Dans l'espèce, c'est avec les sels de strychnine qu'ils ont opéré. Le lévulactate de strychnine est beaucoup moins soluble dans l'eau que le dextrolactate. En soumettant le mélange à une cristallisation fractionnée, et en précipitant la strychnine par l'ammoniaque ou l'hydrate de baryte, on a obtenu un lactate droit d'ammoniaque qui, transformé en sel de zinc, avait la même composition et la même solubilité que le sarcolactate de zinc. Son pouvoir rotatoire spécifique, 50,63, indiquait pourtant qu'il contenait un peu de lactate inactif. De ce lactate droit on pouvait séparer, comme on pouvait s'y attendre, un acide gauche ressemblant à l'acide sarcolactique, et donnant comme lui un anhydride droit.

Les sels gauches retirés du mélange de sels de strychnine étaient mélangés de beaucoup de lactate inactif, qu'on a réussi à éliminer en transformant le tout en sels de zinc, et en soumettant à la cristallisation fractionnée. On en a retiré un acide lactique droit, de même pouvoir rotatoire que l'acide gauche, mais de sens opposé, de sorte que leur mélange en quantités égales redonnait de l'acide lactique inactif.

En mélangeant de même des quantités égales de lactate droit et gauche de zinc, cristallisés avec deux molécules d'eau, on formait du lactate de zinc inactif qui se précipitait à cause de sa solubilité plus faible. La fermentation lactique ordinaire fournit donc deux acides isomériques, de pouvoirs rotatoires égaux et opposés, dont l'un est identique avec l'acide sarcolactique, et l'autre avec l'acide de Schardinger. Mais de ces deux acides, il peut n'y en avoir qu'un de produit, ou ils peuvent être produits ensemble, puis détruits inégalement par le microbe qui les a formés. De là, une foule de combinaisons possibles, que les bactériologistes auront à démêler, maintenant qu'ils savent qu'il y a au moins trois acides lactiques, et qu'ils ont le devoir de ne plus les confondre.

---

Dx.

WYATT JOHNSTON. Prise d'échantillons d'eau pour analyse bactériologique. *Canadian Record of sciences*, 1892.

Il est relativement facile de recueillir des échantillons d'eau pour analyses bactériologiques quand on se borne aux eaux de surface. Il n'en est plus de même quand on veut puiser ces échantillons à une certaine profondeur. M. Miquel a proposé pour cela d'enfoncer dans l'eau, à l'aide d'un plomb de sonde, un tube en verre dont le col effilé est recourbé en col de cygne, et qu'on a vidé d'air et stérilisé. Une hague métallique qui entoure le col et sur laquelle on tire, au moyen d'une ficelle, lorsque le tube est arrivé à la profondeur voulue, provoque une rupture par laquelle l'eau pénètre. Le tube reste ouvert à la montée, ce qui est un inconvénient. M. Wyatt Johnston a fait construire pour le même objet un petit appareil très maniable, formé d'un cadre de fer vertical au milieu duquel le flacon, flambé d'avance et bouché, est saisi par deux mors; le tout est enfoncé à l'aide d'un poids à la profondeur voulue. Un second cadre, relié au premier par deux boudins élastiques, est attaché au bouchon, et peut être manœuvré au moyen d'une ficelle qu'on tire lorsque le flacon est arrivé au niveau où doit se faire la prise. Le flacon se remplit; quand il est plein, on lâche le cadre du bouchon de verre que les boudins remettent en place, et on ramène le tout à la surface. Il y aurait intérêt à faire des observations pareilles en mer, et à chercher quels sont les microbes qui habitent les profondeurs. Beaucoup de savants ont eu cette idée, sans qu'aucun l'ait encore, je crois, amenée à réalisation. M. Wyatt Johnston, qui a à sa portée de grands fleuves, de grands lacs, et l'océan, ferait chose utile en commençant cette étude.

---

Dx.

G.-K. OKLADNYKH. La modification du sang dans le choléra.  
(*Vratch*, 1892, n° 44, p. 1107.)

M. Okladnykh a fait des recherches sur le sang des cholériques pendant la récente épidémie à Saint-Petersbourg. Il a examiné en tout vingt-quatre cas. Il est arrivé aux résultats suivants :

Le nombre des globules rouges s'accroît fortement dès les premiers jours de la maladie. Il atteint ordinairement six à sept millions par millimètre cube. La quantité d'hémoglobine augmente également dans de fortes proportions. La leucocytose est des plus marquées. Le nombre des globules blancs est doublé, triplé, voire même quadruplé. Dans deux cas, les lymphocytes ont atteint le nombre de 40,000 à 45,000 par millimètre cube. Le poids spécifique du sang s'accroît; il est ordinairement de 1,065 à 1,070.

Pendant la guérison, tous ces phénomènes se manifestent en sens inverse. Le nombre des globules rouges tombe à cinq millions par millimètre cube et au-dessous, et la densité à 1,040.

MEY.

---



## INSTITUT PASTEUR

*Personnes mortes de rage après traitement.*

MICOIN AUGUSTE, 48 ans, de Versailles.

Mordu le 15 mars, traité à l'Institut Pasteur du 17 au 31 mars. La rage s'est déclarée le 10 avril; transporté à l'hôpital de Versailles, le malade y est mort le 11.

Le 14 avril, deux cobayes ont été inoculés à l'Institut Pasteur avec le bulbe de Micoin : ils ont été pris de rage le 27 avril.

Micoin avait reçu à la main droite et à la main gauche deux morsures pénétrantes.

L'animal mordeur, un chat errant, abattu aussitôt, fut soumis à l'examen de M. Pouillet, médecin vétérinaire à Versailles, qui prescrivit l'envoi à l'Institut Pasteur de la personne mordue.

CHETAL ANTOINE, 26 ans, cocher à Aix-les-Bains (Haute-Savoie).

Mordu le 3 mai, traité à l'Institut Pasteur du 4 au 18 mai.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés vers le 29 mai, la mort est survenue le 1<sup>er</sup> juin.

Les morsures au nombre de deux, pénétrantes, siégeaient dans le 3<sup>e</sup> espace interdigital de la main droite et sur l'avant-bras droit.

Le chien mordeur avait été soumis à l'examen d'un vétérinaire et reconnu enragé.

CHASTAIN LÉON, 28 ans, employé de la Compagnie des Omnibus à Paris; mordu le 12 mai, traité à l'Institut Pasteur du 15 mai au 3 juin.

CHASTAIN est entré à l'hôpital Beaujon le 23 juin et y est mort le 25.

Les morsures au nombre de 5 étaient situées sur le 5<sup>e</sup> doigt de la main droite. L'une d'elles, linéaire, longue de 3 centimètres, très pénétrante, s'étendait sur la face antérieure de la première phalange et sur le 5<sup>e</sup> métacarpien.

Le chien mordeur avait été reconnu enragé par un vétérinaire.

## INSTITUT PASTEUR.

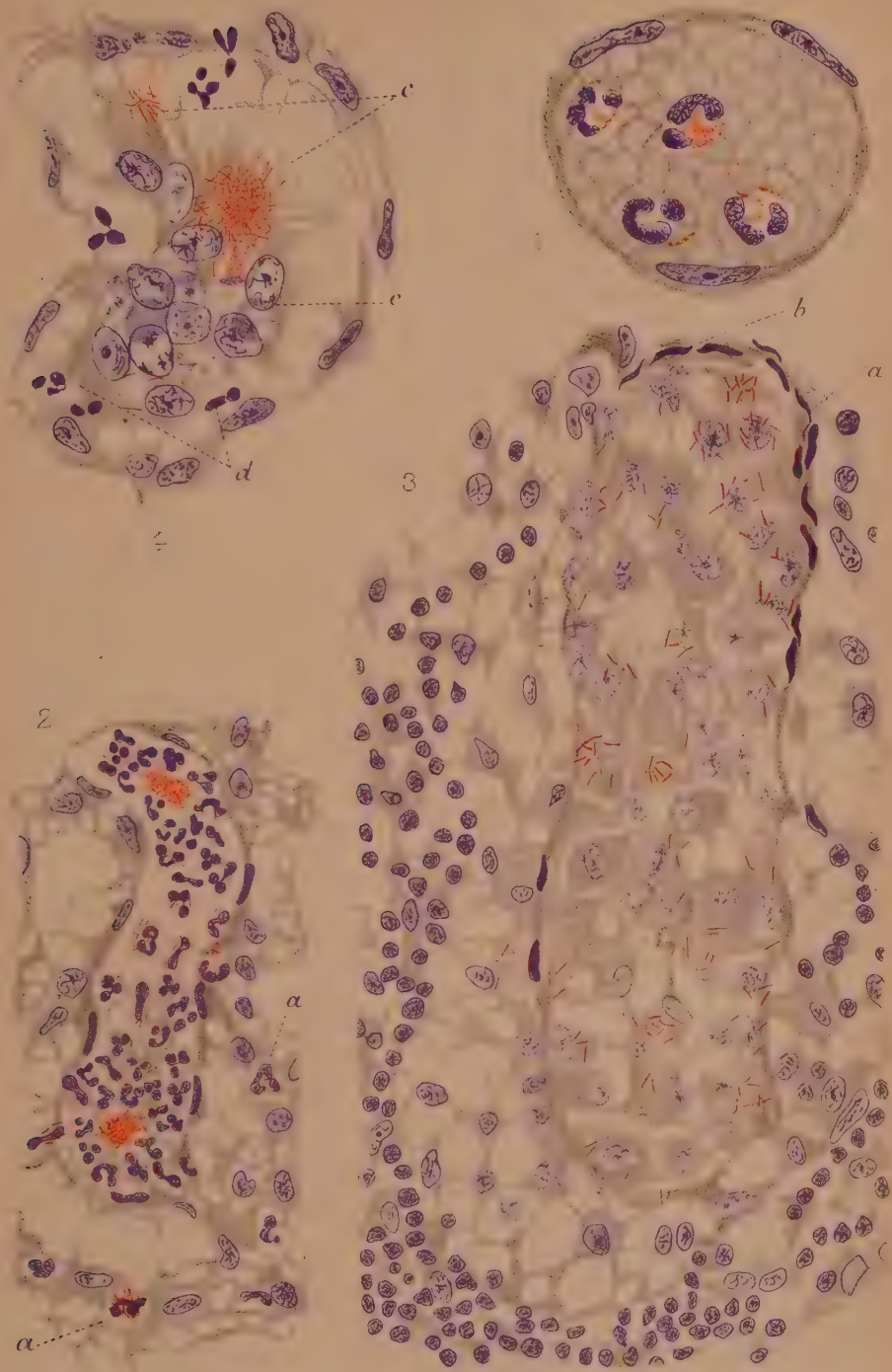
STATISTIQUE <sup>1</sup> DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — MAI ET JUIN 1893.

	A		B		C	
Morsures à la tête { simples . . . . .	1	2	3	7	1	7
et à la figure { multiples . . . . .	1		4		6	
Cautérisations efficaces . . . . .						
— inefficaces . . . . .			2		4	
Pas de cautérisation. . . . .	2		5		3	
Morsures aux mains { simples . . . . .	5	12	59	100	22	51
— multiples . . . . .	7		41		29	
Cautérisations efficaces . . . . .			1			
— inefficaces . . . . .	3		26		27	
Pas de cautérisation. . . . .	9		73		24	
Morsures aux mem- { simples . . . . .	6	9	30	65	12	47
bres et au tronc { multiples . . . . .	3		35		35	
Cautérisations efficaces . . . . .						
— inefficaces . . . . .	4		32		20	
Pas de cautérisation. . . . .	5		32		27	
Habits déchirés . . . . .	8		62		46	
Morsures à nu . . . . .	1		3		1	
Morsures multiples en divers points du corps . . . . .			4	1	3	3
Cautérisations efficaces . . . . .						
— inefficaces . . . . .					1	
Pas de cautérisation. . . . .			4		3	
Habits déchirés . . . . .						
Morsures à nu . . . . .			5		3	
Totaux. { Français et Algériens . . . . .	18	23	171	176	102	106
Etrangers. . . . .	5		5		4	
	A		B		C	
TOTAL GÉNÉRAL . . . . .			305			

Les animaux mordeurs ont été : chats, 12 fois; chiens, 293 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et C<sup>ie</sup>.



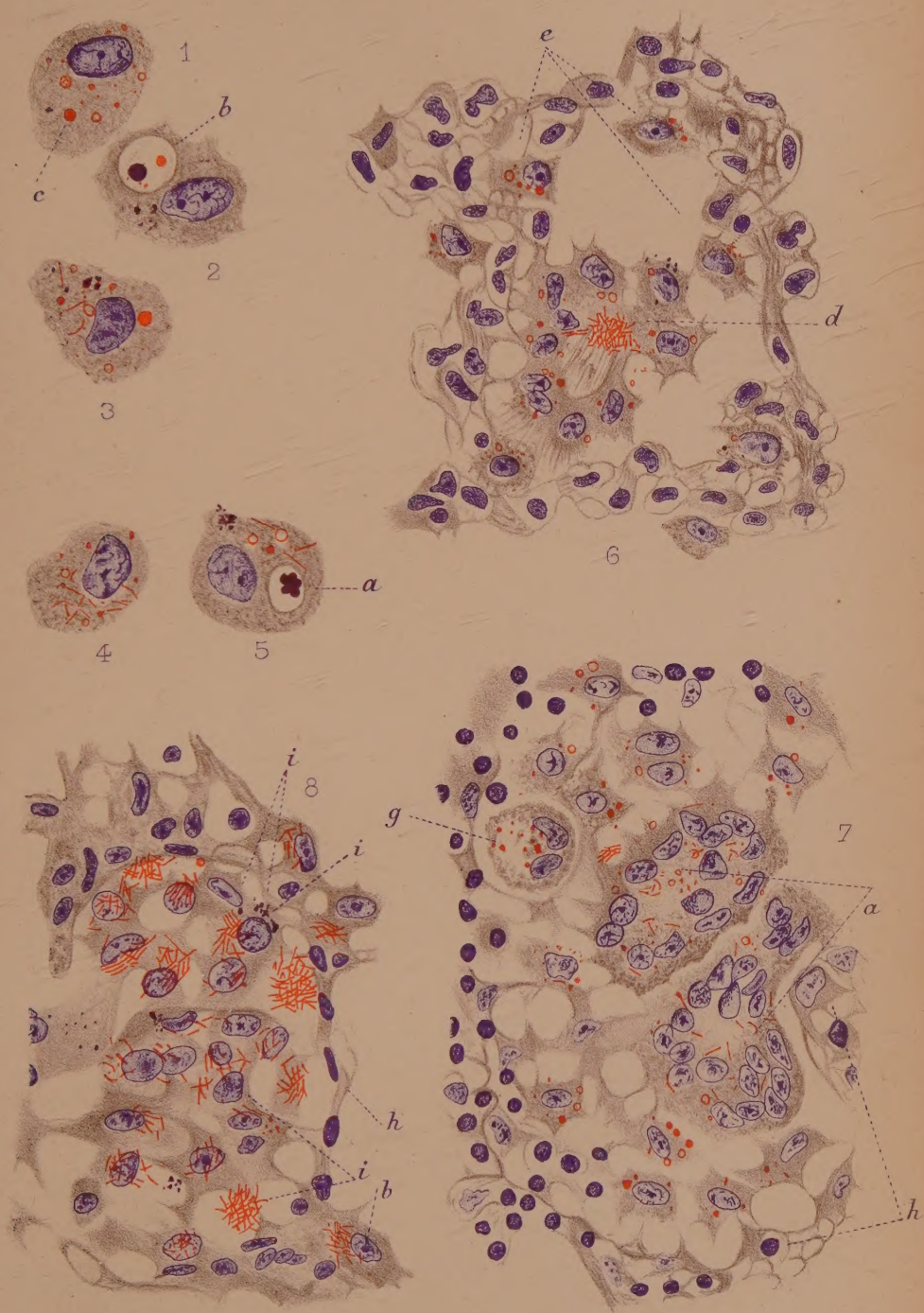
D<sup>r</sup> Borel del.

V. Roussel lith.

Imp. A. Lefebvre & Fils Paris







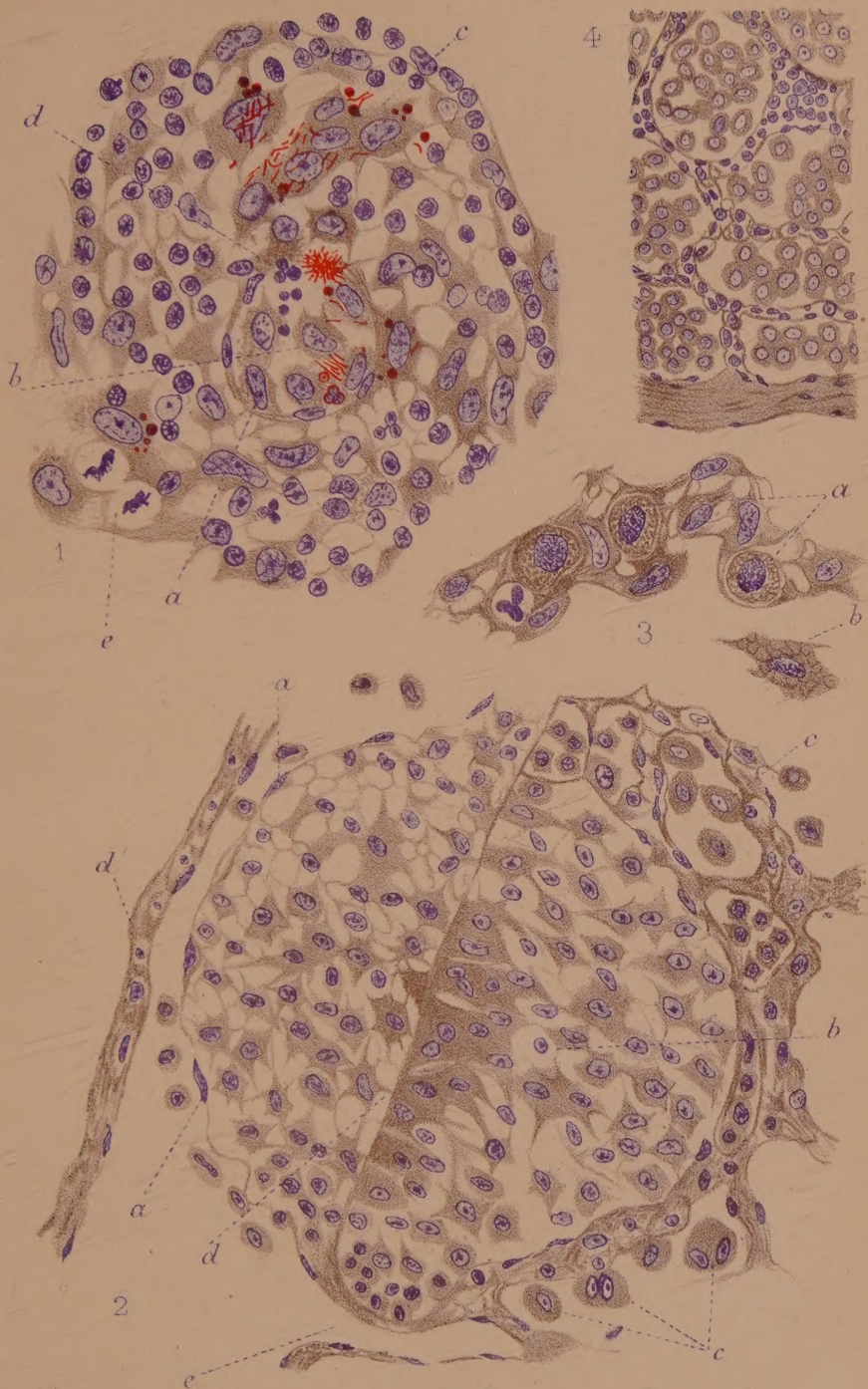
D<sup>r</sup> Borel del.

V Roussel lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris







D<sup>r</sup> Borel del.

V. Roussel lith

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.

